Bioseparaciones

SEGUNDA EDICIÓN



El saber de mis hijos
hará mi grandeza

A. Tejeda
R.M. Montesinos
R. Guzmán

ALWAYS LEARNING

PEARSON

UNIVERSIDAD DE SONORA



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

Bioseparaciones

Segunda Edición

Armando Tejeda Mansir
Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas
Universidad de Sonora
Hermosillo, Sonora México

Rosa María Montesinos Cisneros
Departamento de Matematicas
Universidad de Sonora
Hermosillo, Sonora México

Roberto Guzmán Zamudio
Department of Chemical and Environmental Engineering
University of Arizona
Tucson, Arizona USA

PEARSON

Datos de catalogación bibliográfica

Tejeda Mansir, Armando; Montesinos Cisneros, Rosa María; Guzmán Zamudio, Roberto.

Bioseparaciones. Segunda edición.

PEARSON EDUCACIÓN, México, 2011
ISBN: 978-607-32-0945-8

Formato: 18.5 x 23.5 cm Páginas: 704

Editores: Carlos Mario Ramírez Torres
carlosmario.ramirez@pearsoned.com
Marianna Lyubarets (Universidad de Sonora)
Editor de desarrollo: Claudia Silva Morales

SEGUNDA EDICIÓN, 2011

Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana. Reg. Núm. 1031

“Este libro se publicó con el apoyo del Programa de Mejoramiento del Profesorado PROMEP/103.5/11/1535”

ISBN: 978-607-32-0945-8
ISBN e-book: 978-607-32-0946-5
ISBN e-chapter: 978-607-32-0947-2
ISBN: 978-607-8158-28-7 (UNISON)

Impreso en México. *Printed in Mexico*.
1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 – 14 13 12 11

PEARSON

www.pearsoneducacion.net ISBN: 978-607-32-0945-8

Contenido

Prefacio

Actualmente, es impresionante el impacto que tiene la biotecnología en diversas áreas, particularmente en la diversificación y optimización de los bioprocesos para la producción de alimentos y medicamentos, lo cual permite incrementar nuestra capacidad para cubrir dos de las necesidades humanas básicas.

Una parte importante de los bioprocesos, tanto desde el punto de vista económico como del técnico, la constituye las operaciones de bioseparación necesarias para procesar los caldos biológicos y obtener los productos de acuerdo con las especificaciones requeridas.

La motivación para realizar este trabajo se deriva de nuestro convencimiento de la importancia de la enseñanza e investigación de los principios básicos y las aplicaciones de las operaciones de bioseparación, para poder complementar los esfuerzos que se realizan en otros campos de estudio de los bioprocesos. En este sentido, es nuestra intención aportar un documento que contribuya a sistematizar y ampliar la enseñanza de las bioseparaciones.

Este libro está escrito para servir de introducción al estudio de las bioseparaciones, puede ser utilizado por alumnos de los últimos semestres de carreras de biotecnología, química de alimentos, ingeniería bioquímica, ingeniería sanitaria, ingeniería en alimentos, ingeniería química o bien en los primeros cursos de programas de posgrado en el área de biotecnología o áreas afines.

Este trabajo se divide en seis partes y 14 capítulos. La primera parte es una introducción a los procesos de bioseparación y a los aspectos principales de la selección de las operaciones que los integran. En las siguientes cuatro partes: Recuperación del producto, Concentración, Purificación y Acabado se abordan las principales operaciones de bioseparación siguiendo una secuencia típica de un bioproceso, tratando con ello de conservar un enfoque unitario más que describir procesos particulares. La última parte del libro se relaciona con el Diseño del Bioproceso e integra los aspectos que se revisan en las partes previas.

En cada capítulo dedicado a una operación determinada, se presentan los fundamentos de la operación, los equipos comúnmente empleados para realizarla y los principales métodos de diseño. En cada sección se incorporan ejemplos ilustrativos que se complementan con problemas de final de capítulo.

En esta segunda edición que aparece 15 años después de la primera, hemos realizado un esfuerzo por mejorar y actualizar el contenido del libro. También hemos renovado la presentación de las ecuaciones y figuras del texto.

Un aspecto distintivo de esta nueva edición es el uso de más apoyo de programas de computación. Se han incluido en los capítulos del libro varios ejemplos resueltos y problemas propuestos utilizando Matlab. Así mismo, se introduce el uso de paquetes computacionales para el diseño de bioprocesos.

Varios factores se combinaron para la publicación del presente trabajo. Nuestros estudiantes han contribuido a la discusión del contenido del material de este libro y estimularon su publicación. Sin duda un apoyo determinante para lograr este objetivo fue el que se nos brindó por parte de la Universidad de Sonora y de la Universidad de Arizona, a través de nuestros respectivos departamentos. Nuestro intercambio académico con el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, el Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa y el Instituto de Biotecnología de la UNAM, motivaron y contribuyeron significativamente a la realización del trabajo. Deseamos expresar un sincero agradecimiento por todos estos apoyos recibidos.

Dr. Armando Tejeda Mansir
Dra. Rosa Ma. Montesinos Cisneros
Dr. Roberto Guzmán Zamudio

Parte I

El Proceso de Bioseparación

Esta primera parte del libro destaca la importancia de las bioseparaciones en los procesos para la obtención de productos biotecnológicos o bioprocesos. En el Capítulo 1 se presenta una perspectiva de las operaciones de bioseparación y sus principales características. El Capítulo 2 trata sobre los factores y metodologías que deben tomarse en cuenta para la correcta selección de un bioproceso.

Capítulo 1

Una Perspectiva de las Bioseparaciones

1.1. Introducción

El cultivo de células con el objeto de obtener productos útiles, es una actividad que ha realizado el hombre prácticamente durante toda su historia. Recientemente este tipo de bioprocesos se enmarcan dentro de lo que ahora se conoce como Biotecnología. Ésta ha evolucionado a partir de los conocimientos generados en diversas disciplinas, tanto del área de las ciencias básicas como de las ingenierías. Hoy, la biotecnología puede ser definida como la aplicación de la ciencia y la tecnología en organismos vivos, así como a sus partes, productos y modelos, para modificar materiales vivos o no vivos para la producción de conocimiento, bienes y servicios (OECD, 2005).

1.1.1. Productos Biotecnológicos

El mercado actual de productos biotecnológicos es del orden de miles de millones de dólares (Demain, 2007). Los bioprocesos correspondientes presentan una enorme versatilidad que involucra desarrollos basados en microorganismos, enzimas, células de mamífero, plantas y animales. Comprenden la producción de metabolitos primarios como aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, solventes y ácidos orgánicos; metabolitos secundarios como antibióticos y glicopéptidos; bioprocesos de biotransformación para producción de agentes hipocolesterolémicos, inmunosupresores, compuestos anticancerígenos y biopesticidas; y biofarmaceuticos como proteínas recombinantes (hormonas, factores sanguíneos, agentes trombolíticos, factores hematopoyéticos), vacunas, interferones, interleucinas y anticuerpos monoclonales.

1.1.2. Bioprocesos y Bioseparaciones

Las operaciones que comprenden los bioprocesos reactivos a escala comercial (Fig. 1.1), se han dividido tradicionalmente en *operaciones previas* (procesos “upstream”) y *operaciones posteriores o bioseparaciones* (procesos “downstream”).

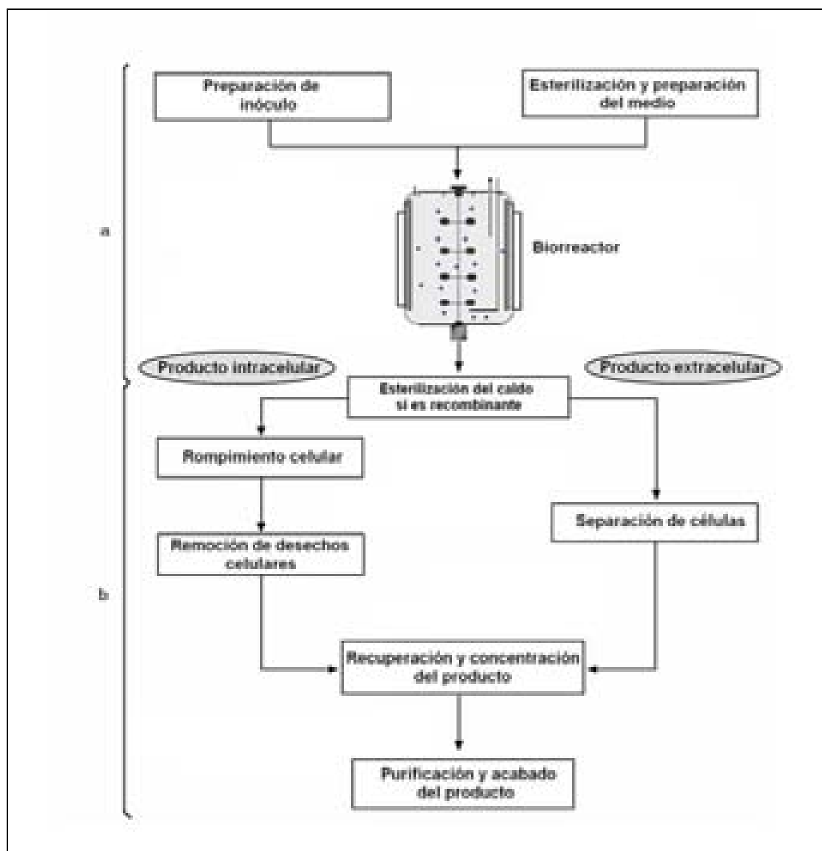


Figura 1.1: Operaciones de un bioproceso. a) Operaciones previas y b) Operaciones posteriores o bioseparaciones. Adaptada de: Bujurstrom, 1985.

Las operaciones previas comprenden la preparación del medio, la esterilización y el funcionamiento del biorreactor (Cooney, 1990). Los procesos de bioseparación involucran la recuperación, concentración, purificación y acabado de los productos provenientes del biorreactor. Comprenden todos los tratamientos que requiere el caldo de cultivo para la obtención del producto en las condiciones de pureza, y actividad deseadas. Cuando el producto de interés es in-

tracelular es necesario romper las células y separar los restos celulares. En el caso de que el producto sea extracelular (o cuando las células son el producto), se requiere separar las células del caldo. Una vez obtenido el caldo de interés éste se somete a las operaciones de recuperación, concentración, purificación y acabado necesarias para obtener el producto en las condiciones necesarias.

Las bioseparaciones también son muy empleadas en los bioprocesos extractivos, donde el producto de interés se obtiene directamente de sus fuentes naturales como la obtención de proteínas del plasma sanguíneo, enzimas de tejidos animales y taninos de plantas. Otro campo de aplicación de las bioseparaciones es en los bioprocesos enzimáticos para el procesamiento de los productos obtenidos, como en la obtención de jarabes fructosados. La aplicación de las bioseparaciones es muy amplia, pero los principios en que están basadas son utilizados de manera similar en los diferentes bioprocesos.

1.2. Tipos de Bioprocesos y Bioproductos

Actualmente se pueden distinguir de manera general tres generaciones de bioprocesos, en relación al tipo de bioseparaciones que éstos involucran (Tabla 1.1). La primera generación comprende el conjunto de bioprocesos desarrollados mediante cultivos de organismos no recombinantes, cuyos productos se obtienen en forma activa tanto si son intracelulares o si son secretados al medio de cultivo. En esta generación se encuentran los bioprocesos de la biotecnología tradicional como los de la producción de etanol, enzimas, ácido cítrico y antibióticos. Los productos de estos bioprocesos se presentan en concentraciones altas al inicio de la etapa de separación y no requieren de una extremada pureza para su venta.

Los descubrimientos asociados con la biología molecular y la ingeniería genética logrados en las últimas décadas, han ampliado las capacidades biotecnológicas del hombre. En esta etapa podemos situar una segunda generación de productos de la biotecnología como la insulina humana, la hormona de crecimiento y el alfa interferón, entre otros. Estos son producidos intracelularmente utilizando células recombinantes de *Escherichia coli.* Se caracterizan por encontrarse en bajas concentraciones dentro de la célula, son de elevado peso molecular, tienen propiedades similares a los contaminantes y requieren un alto grado de pureza. Además, generalmente al producirse en la célula no poseen actividad biológica por tratarse de cadenas peptídicas sin la conformación o estructura apropiada; lo que se traduce en la necesidad de aplicarles tratamientos fisicoquímicos adicionales para lograr obtener el producto en su estado activo. Los desarrollos recientes en investigaciones terapéuticas tales como el uso de DNA plasmídico (pDNA) en terapia génica y vacunas han fomentado el desarrollo de bioprocesos novedosos para la producción de pDNA a gran escala utilizando también *E. coli* como célula hospedera (Tejeda y Montesinos, 2008).

La tercera generación de la biotecnología, la podemos caracterizar por bioprocesos mediante los cuales se obtienen productos extracelulares en células recombinantes, la mayoría de las cuales son eucarióticas. En estos sistemas se ha observado la capacidad no sólo de producir exógenamente el producto

Tabla 1.1: Características de los Bioprocesos y los Bioproductos.

Característica	Generación		
	Primera	Segunda	Tercera
Período	- 1975	1975 -	1985 -
Tipo de células	No recombinantes	Recombinantes	Recombinantes
Fortaleza de las células	Alta	Alta	Baja
Crecimiento	Rápido	Rápido	Lento
Mantenimiento	Bajo	Bajo	Alto
Conocimiento de propiedades básicas	Alto	Alto	Medio
Conocimiento Tecnológico	Alto	Alto	Medio
Productos			
Tipo	Antibióticos Aminoácidos	Insulina humana HC	Factor VIII, tPA EPO, mAb
Localización	Extracelular e intracelular	Intracelular	Extracelular
Tamaño	Intermedio	Macromoléculas	Macromoléculas
Actividad al secretarse	Sí	No	Sí
Pureza deseada	Alta	Muy alta	Muy alta
Similitud con contaminantes	Baja	Alta	Alta
Valor	Bajo	Alto	Alto

deseado, sino que éste se obtiene en forma activa. El factor VIII de la sangre, la eritropoyetina (EPO) estimuladora de la formación de eritrocitos, el agente trombolítico activador del plasminógeno tisular (t-PA), los anticuerpos monoclonales (mAb) para el tratamiento del cáncer y las citoquinas como los interferones α y β con actividad antiviral, son productos característicos de esta generación. Debido a su empleo con fines terapéuticos, estos productos deben ser obtenidos con un alto grado de pureza (Datar *et al.*, 1993).

Actualmente, de 151 productos recombinantes aprobados por la FDA y la EMEA, 59 (39 %) son obtenidos en células de mamífero, 45 (29.8 %) en *E. coli*, 28 (18.5 %) en *S. cerevisiae*, 17 (11.2 %) en células de hibridomas, 1 (0.67 %) en leche de cabra y 1 (0.67 %) en células de insecto (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009).

Varios bioprocesos tanto de la segunda como de la tercera generación pueden considerarse bien establecidos y muy eficientes. Otros se encuentran en una etapa de desarrollo que requiere ampliar el conocimiento de los aspectos fundamentales del comportamiento de las operaciones principales, para contribuir a su optimización y facilitar su validación (Asenjo y Andrews, 2008).

1.2.1. Propiedades de los Bioproductos

El diseño del esquema de bioseparación de un producto dado debe tomar en cuenta la naturaleza del material inicial, la localización del producto (si el producto es intracelular o extracelular), el volumen a procesar y la concentración inicial del producto. El diseño también debe tomar en cuenta la sensibilidad del

producto a factores como la temperatura, pH, fuerza iónica, enzimas degradativas o sustancias químicas. La forma física, la pureza y los requerimientos de calidad del producto también son factores que deben ser considerados en el diseño.

El conocimiento tecnológico de los procesos biotecnológicos de segunda y tercera generación es limitado. Actualmente es necesario profundizar en los métodos de escalamiento de algunas operaciones, ya que generalmente se han adaptado a escala comercial a partir del laboratorio. En el proceso de escalamiento es necesario considerar los volúmenes y normas del mercado para el producto (Null, 1987).

La biotecnología ha adoptado con éxito operaciones de la ingeniería química para la purificación de productos biotecnológicos tradicionales. Sin embargo, existen limitantes para lograr ésto cuando se trata de obtener productos característicos de la segunda y tercera generación. Existe una necesidad real de desarrollar procesos de bioseparación apropiados, con la participación de ingenieros, bioquímicos y biólogos con el propósito de lograr, tanto la pureza deseada del producto, como la eficiencia y rentabilidad del mismo (Wang, 1988).

1.3. Operaciones de Bioseparación

Las operaciones de bioseparación se basan en las diferencias que existen entre las propiedades fisicoquímicas de los componentes presentes en el caldo de cultivo. El objetivo del diseño de un proceso de bioseparación es explotar esta diferencia en las propiedades en la forma más económica. Generalmente existe una propiedad específica que es la base primaria para la separación. Los métodos de bioseparación usados con más frecuencia, así como la propiedad en la que se basan, se muestran en la Tabla 1.2.

1.3.1. Esquema RIPP

Las bioseparaciones generalmente comprenden varias operaciones que se agrupan de acuerdo con un esquema típico en operaciones de: recuperación (remoción de sólidos y ruptura celular), concentración, purificación y acabado (RIPP de sus siglas en inglés). Esta estrategia involucra el uso de operaciones de baja resolución en la recuperación y concentración (*e.g.* filtración, extracción) y operaciones de alta resolución para la purificación y el acabado (*e.g.* cromatografía, cristalización, electroforesis).

1.3.2. Bioproceso Típico

Los bioprocesos para la producción de insulina humana están bien documentados en la literatura y permiten presentar la gran diversidad de operaciones unitarias que deben ser consideradas en las bioseparaciones (Ladish y Kolmann, 1992). La insulina es una hormona pancreática que ha sido utilizada en el tratamiento de la diabetes tipo I desde principios del siglo pasado. La

Tabla 1.2: Operaciones de bioseparación y su propiedad básica.

Tipo	Método (Operación)	Propiedad
Recuperación	Filtración	Tamaño
	Centrifugación	Tamaño, densidad
	Rompimiento celular	Estructura celular
Concentración	Extracción	Distribución entre fases
	Adsorción	Sorción superficial
	Destilación	Presión de vapor
Purificación	Cromatografía	Depende de fase estacionaria
	Precipitación	Solubilidad
	Ultrafiltración	Tamaño molecular
	Ósmosis inversa	Difusividad y solubilidad
	Electroforesis	Carga eléctrica y movilidad
	Diálisis	Difusividad
	Electrodiálisis	Carga eléctrica y movilidad
Acabado	Cristalización	Punto de fusión o solubilidad
	Secado	Temperatura, humedad

insulina está formada por las cadena pepítidicas A y B unidas por puentes disulfuro. La cadena A consta de 21 residuos de aminoácidos y la cadena B de 30. La demanda mundial de insulina en el 2006 osciló entre 7,000 y 10,000 kg/año y se proyecta que alcanzará entre 15,000 y 20,000 kg/año para el año 2012. El mercado mundial de la insulina se estima en $4,000 millones de dólares y las principales compañías productoras son Novo Nordisk, Eli Lilly y Sanofi Aventis. (Ainsworth, 2005).

Al menos tres tecnologías han sido desarrolladas para producir insulina basadas en bioprocesos con células recombinantes. El *Método de las dos cadenas* fue desarrollado por la compañia Genetech y escalado por Eli Lilly. En este método las cadenas A y B de la insulina se producen en *E. coli* por separado y posteriormente se fusionan para formar la insulina recombinante. El *Método de la proinsulina intracelular* ha sido comercializado por Eli Lilly y se basa en la producción en *E. coli* de las cadenas A y B fusionadas formando un complejo llamado proinsulina que una vez procesado da lugar a la insulina recombinante. El *Método de la proinsulina extracelular* fue desarrollado por Novo Nordisk y se basa en la producción en *S. cerevisiae* de las cadenas A y B fusionadas formando un precursor que es excretado por la célula y posteriormente procesado para obtener insulina recombinante.

Método de la proinsulina intracelular

En la Figura 1.2 se presentan los principales pasos para la producción de insulina por el *Método de la proinsulina intracelular*. Las células de *E. coli* sobreproducen cuerpos de inclusión (CI) formados por el complejo Trp-LE'-Met-proinsulina (preproinsulina). Trp-LE'-Met es una señal peptídica de 121 residuos

de aminoácidos unida a la proinsulina de 82 residuos. La proinsulina se obtiene mediante la recuperación de los CI, la solubilización de éstos y la ruptura del enlace de la señal peptídica utilizando bromuro de cianógeno (CNBr) que corta por el lado carboxílico el residuo de metionina. Dado que las cadenas peptídicas A, B y C no contienen residuos de metionina o triptófano, estas permanecen intactas. La molécula de proinsulina obtenida, se somete a replegamiento para permitir que se formen los enlaces disulfuro entre las cadenas. La proinsulina es luego sometida a sulfitolisis oxidativa para su plegamiento apropiado. Finalmente, se elimina la cadena peptídica C que une las cadenas A y B para obtener la insuluna sintética (Datar y Rosén, 1990).

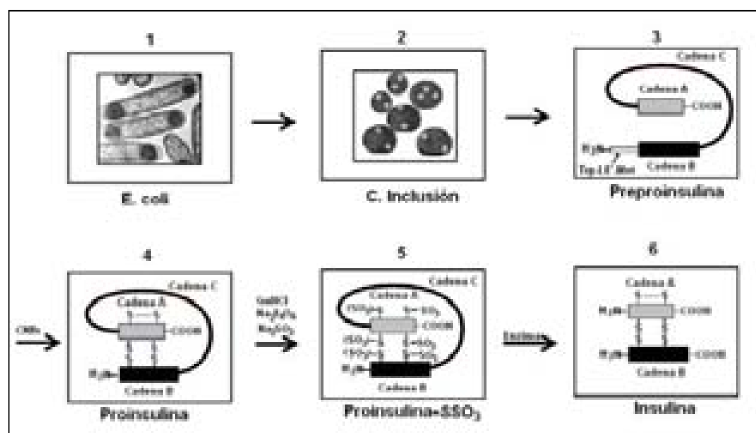


Figura 1.2: Los principales pasos para la producción de insulina por el "Método de la proinsulina intracelular"se basan en la obtención de: 1) *E. coli* por cosecha, 2) CI por rompimiento celular, 3) preproinsulina por solubilización de los CI, 4) proinsulina por rompimiento con CNBr, 5) proinsulina-SSO_3 por sulfitolisis oxidativa y 6) insulina por acción enzimática.

En la Figura 1.3 se presenta el diagrama de flujo del bioproceso para obtención de insulina mediante el “Método de la proinsulina intracelular”. El diagrama completo consta de las operaciones previas y las operaciones posteriores o bioseparaciones.

Operaciones previas: Sección de fermentación

Las operaciones previas del bioproceso son la preparación y esterilización del medio, la compresión y esterilización del aire, así como la fermentación (Fig. 1.3). El medio de cultivo se prepara en el tanque V-101 y se esteriliza continuamente en el equipo ST-101. El aire es provisto por el compresor G-101 y se mezcla

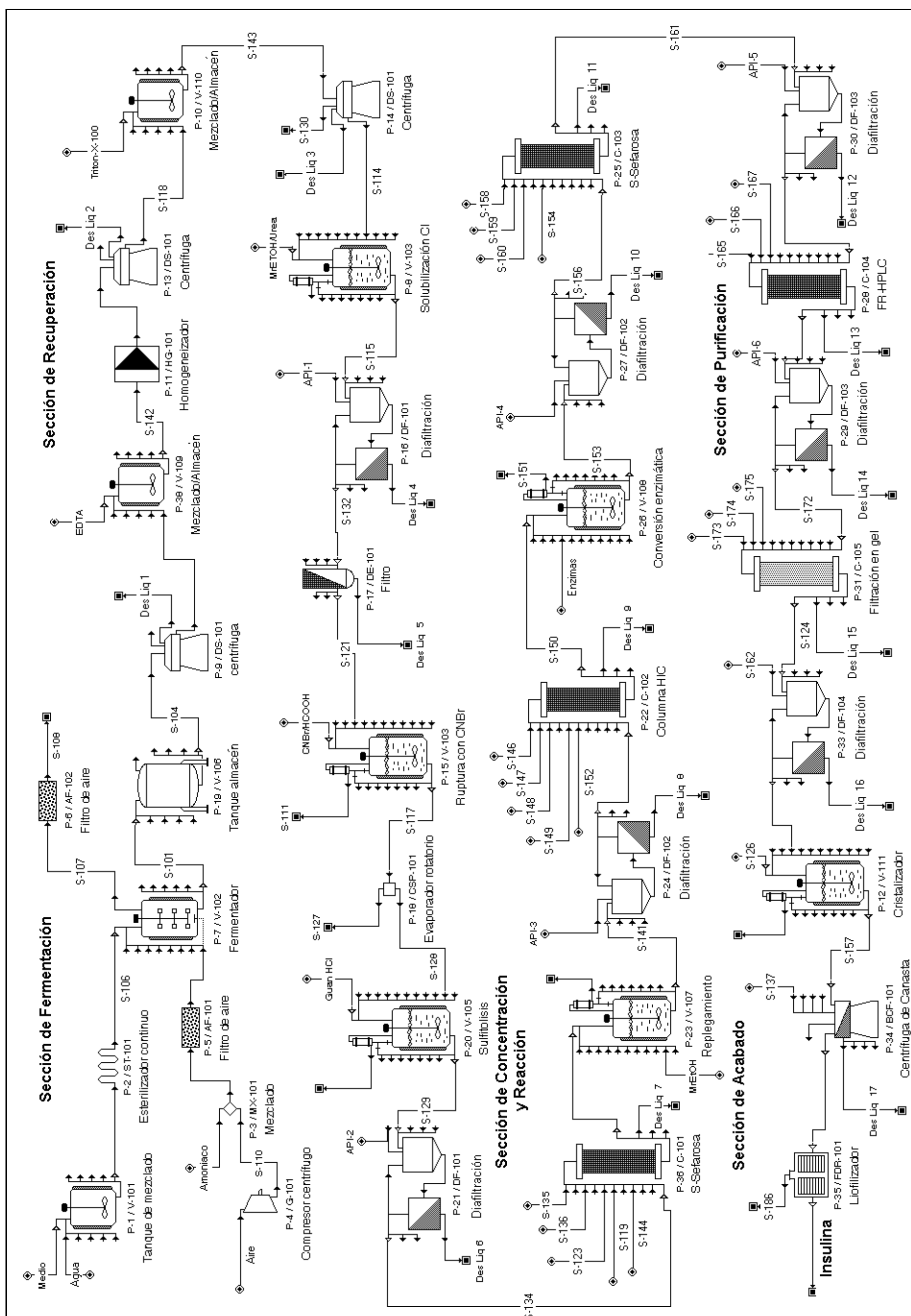


Figura 1.3: Diagrama de flujo de un proceso para la producción de insulina recombinante humana (biosintética). Adaptada de Heinzle *et al.*, 2006.

con amoníaco, para posteriormente esterilizarse por filtración en el equipo AF-101.Tanto el medio como la mezcla aire amoníaco se alimentan al fermentador V-102. Este fermentador es inoculado mediante un tren de preparación de inóculo de dos pasos (no se muestra). Al final de la fermentación se obtiene en el biorreactor un caldo celular de *E. coli* conteniendo los CI formados por Trp-LE'-Met-proinsulina, que es bombeado a un tanque de almacenamiento donde se mezcla con una solución del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Bioseparaciones

Las bioseparaciones para la producción de insulina por el método de la proinsulina intracelular, constan de las etapas de recuperación, concentración, purificación y acabado.

Recuperación

Cosecha celular El primer paso de la ruta de bioseparación consiste en la recuperación de las células por centrifugación. El caldo concentrado se envía a un tanque de almacenamiento V-106 que es la interfase entre las operaciones previas y las bioseparaciones. Este paso se realiza por medio de 3 centrífugas de disco operando en paralelo DS-101 (sólo se muestra una en el diagrama), bajo el procedimiento 9 (P-9). El lodo recuperado se diluye con una solución de EDTA en buffer TRIS en el tanque de mezclado V-109 para facilitar la separación de los CI de los restos celulares.

Rompimiento celular y recuperación de CI En este caso, el producto es intracelular y se requiere el rompimiento de las células por medio de homogeneizadores de alta presión HG-101 para liberar los CI. El homogeneizado obtenido es centrifugado para recuperar los CI, utilizando las mismas centrífugas DS-101 bajo el procedimiento 13 (P-13). Los CI se recuperan en la fase pesada y la mayoría de los restos celulares quedan en la fase ligera, debido a la mayor densidad y tamaño de los CI. La fase pesada es mezclada con una solución del detergente Triton-X100 y recentrifugada en las centrífugas DS-101. Este lavado facilita la separación de los CI de proteínas solubles y restos celulares.

Solubilización de CI La suspensión que contiene los CI se transfiere a un reactor recubierto de vidrio V-103, donde se hace reaccionar con urea y 2-mercaptoetanol. La urea es un agente caotrópico que disuelve las proteínas desnaturalizadas de los CI y el 2-mercaptoetanol es un agente que reduce los enlaces disulfuro. Al final de la reacción de solubilización, se reemplaza la urea y el 2-mercaptoetanol por agua para inyección (API) y se concentra la solución en la unidad de diafiltración DF-101. Las partículas finas remanentes se eliminan en el filtro DE-101 para evitar problemas en los equipos de cromatografía.

Reacciones

Rompimiento con CNBr La proteína quimérica Trp-LE'-Met-proinsulina es fragmentada utilizando bromuro de cianógeno (CNBr) en una solución de ácido fórmico en el reactor V-103, obteniéndose la proinsulina desnaturalizada y la secuencia Trp-LE'-Met. La proinsulina se obtiene intacta ya que no contiene residuos de metionina ni triptófano que son los sitios donde hidroliza el CNBr. Al final de esta reacción, el ácido fórmico, el CNBr que no reaccionó y el gas cianuro producido se eliminan en un evaporador rotatorio al vacío CSP-101. El gas cianuro es tóxico y es necesario eliminarlo en un adsorbedor con una solución de hipoclorito.

Sulfitolisis La sulfitolisis de la proinsulina desnaturalizada se efectúa en el reactor V-105, adicionando hidrocloruro de guanidina (GuHCl), bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), sulfito de sodio (Na_2SO_3) y tetrationato de sodio ($Na_2S_4O_6$). Esta operación se utiliza para desdoblar la proinsulina, romper los enlaces disulfuros y adicionar grupos sulfito (SO_3^{-2}) a los residuos de azufre de las cisteínas. Este paso es necesario debido a que la proinsulina puede no estar correctamente plegada desde su síntesis o porque el tratamiento con CNBr rompe enlaces disulfuro existentes. El GuHCl previene el replegamiento de la molécula y el entreplegamiento entre distintas moléculas. Al final de la sulfitolisis la solución es diafiltrada con API en la unidad DF-101.

Concentración

Cromatografía de intercambio iónico La proinsulina (S-SO_3) obtenida en el paso anterior, se hace pasar por tres columnas de intercambio catiónico de S-sefarosa (sulfopropil) C-101operando en paralelo. En la elución de la columna se utiliza una solución de urea para prevenir el replegamiento. La operación permite concentrar la solución y eliminar proteínas contaminantes.

Replegamiento Esta operación permite la remoción de los grupos sulfito (SO_3^{-2}), la formación de los enlaces disulfuro y el plegamiento correcto de la proinsulina en su forma nativa. Se realiza en el reactor V-107 e involucra una reducción con una solución diluida mercaptoetanol (MrEtOH) que facilita la formación de los enlaces disulfuro y evita entre-plegamiento. Al final del paso de replegamiento el MrEtOH se sustituye por API y se concentra la solución en la unidad de diafiltración DF-102. La solución de proinsulina obtenida se hace pasar por una columna de cromatografía de interacción hidrofófica C-102 (HIC de sus siglas en inglés), para eliminar gran parte de las proteínas contaminantes.

Conversión enzimática La remoción de la cadena C de la proinsulina que conecta las cadenas A y B, se realiza enzimáticamente utilizando tripsina y carboxipeptidasa B en el reactor V-108. La tripsina rompe en el extremo carboxi entre residuos lisina y arginina. La carboxipeptidasa B remueve grupos aminoácidos terminales. La solución obtenida se lava con API y se concentra 4 veces en la unidad de diafiltración DF-102.

Purificación

Cromatografía de intercambio iónico La insulina se purifica mediante una secuencia cromatográfica multimodal basada en diferencias de carga, hidrofobicidad y tamaño entre la insulina y sus contaminantes. El primer paso de purificación de la solución que contiene la insulina se realiza en una columnas de intercambio catiónico de S-sefarosa C-103. En este paso se elimina gran parte de la proinsulina no convertida y de las proteínas contaminantes. Al final de la operación se lava la solución para eliminar el buffer de elución con API y se concentra la solución dos veces en la unidad de diafiltración DF-103.

Cromatografía de fase reversa La purificación continúa utilizando la columna C-104 de cromatografía de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) de ácido fenil borónico (PBA). Mediante la operación se logra eliminar las diversas proinsulinas y el resto de las proteínas contaminantes. La solución obtenida se lava con API y se concentra 2 veces en la unidad de diafiltración DF-103.

Cromatografía de filtración en gel La purificación se completa en una columna de filtración en gel C-105 en donde la insulina se obtiene prácticamente pura. Al final de la operación la solución se lava con API y se concentra 10 veces en la unidad de diafiltración DF-104.

Acabado

Cristalización La solución obtenida se alimenta a un cristalizador enchaquetado V-111, donde se mezcla con acetato de amonio (CH_3-COO-NH_4) y cloruro de cinc ($ZnCl_2$) . La insulina cristaliza como Zn_2-Insulina$_6$. Al final de la cristalización, los cristales son recuperados en una centrífuga de canasta BCF-101.

Secado Finalmente, los cristales se secan en el liofilizador FDR-101. El rendimiento global del bioproceso es del 32 % y la pureza de la insulina obtenida varía entre 99.5 a 99.9 %.

1.3.3. Comportamiento del Bioproceso y Calidad del Producto

Las especificaciones son los estándares técnicos, regulatorios y legales que el producto debe cubrir de acuerdo a su uso. Los aspectos de rendimiento, pureza y actividad del producto son básicos para determinar la viabilidad de un bioproceso, debido a que para lograr el grado de purificación requerido en los productos biotecnológicos, generalmente el bioproceso debe realizarse en varios pasos.

Rendimiento

Las operaciones de bioseparación para un proceso deben seleccionarse cuidadosamente con el fin de que el costo sea mínimo. Es decir, si el rendimiento por paso es bajo y se requieren varias pasos, puede tenerse un bioproceso no viable económicamente debido a su aún más bajo rendimiento global. El rendimiento está dado por:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{cantidad de producto obtenido}}{\text{cantidad de producto alimentado}} \tag{1.1}$$

Para un bioproceso de n pasos, con un rendimiento por paso $RP\,\%$, se puede establecer que el rendimiento global $RG\,\%$ está dado por:

$$RG\,\% = (RP)^n \times 100 \tag{1.2}$$

Ejemplo 1.1. Cálculo del rendimiento global de un esquema de bioseparación.

Calcular el rendimiento global ($RG\,\%$) de un esquema de bioseparación de $n = 10$ pasos. Cuando el rendimiento por paso ($RP\,\%$) es de: a). 60 % y b). 30 %

Solución:

Utilizando la ecuación (1.2) se tiene:

a)

$$RG\ \% = (0.6)^{10} \times 100 = 0.006 \times 100 = 0.6\,\%$$

b)

$$RG\ \% = (0.3)^{10} \times 100 = 0.000006 \times 100 = 0.0006\,\%$$

Esto significa que se requiere 1000 veces más cantidad de materia prima para lograr la misma masa de producto purificado, cuando el RP desciende de 60 a 30 %. Por otra parte si el rendimiento promedio por paso fuese de 95 %, el rendimiento total alcanzado sería del 60 % (Hearn y Anspach, 1990).

Ejemplo 1.2. Gráfica del rendimiento global

Graficar el efecto del rendimiento por paso ($RP\,\%$) y el número de pasos (n) sobre el rendimiento global ($RG\,\%$) de un bioproceso, considerando rendimientos por paso de 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, y 95 %.

Solución:

El programa MATLAB para la solución del ejemplo se presenta en la Figura 1.4.

La Figura 1.5 muestra como varía el rendimiento global en función del número de pasos y el rendimiento por paso. El rendimiento global aumenta conforme se disminuye el número de pasos de procesamiento y se aumenta el rendimiento por paso.

```
% Bioseparaciones 2da Edición
% Ejemplo_1.2 Cálculo del rendimiento global
% Nombre del archivo ejemplo_1.2
clear
clf
% Entrada de datos
n=[1:10];
rp=[60 70 80 90 95];
% Cálculos
p=length(n);
q=length(rp);
for j=1:q
for i=1:p
    rg(i,j)=((rp(j)/100)^i)*100;
end
end
% Impresión de resultados
plot(n,rg(:,1),'ko-');
hold on
plot(n,rg(:,2),'kp-');
hold on
plot(n,rg(:,3),'kv-');
hold on
plot(n,rg(:,4),'ks-');
hold on
plot(n,rg(:,5),'ko-');
legend('RP=60%','RP=70%','RP=80%','RP=90%','RP=95%')
xlabel('Número de pasos','FontSize',14)
ylabel('Rendimiento Global %','FontSize',14);
```

Figura 1.4: Programa MATLAB para la solución del Ejemplo 1.2.

Pureza

La pureza necesaria y actividad generalmente están definidos por agencias reguladoras como la FDA de acuerdo al uso que se le va a dar al producto. En el caso de productos para uso parental en humanos la pureza requerida es mayor al 99.5 % generalmente. La pureza está dada por:

$$\text{Pureza} = \frac{\text{cantidad de producto}}{\text{cantidad total}} \tag{1.3}$$

Actividad específica

Una medida de la pureza de un producto es la actividad específica que está dada por:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{unidades de actividad biológica}}{\text{masa}} \tag{1.4}$$

Ejemplo 1.3. Estimación del rendimiento y la pureza y de una enzima en un proceso de purificación.

En el desarrollo de un bioproceso para la obtención de una enzima a partir de *E. coli*, se sabe que la bacteria tiene un 80 % de humedad y que el 60 % de su peso seco es proteína. El proceso de purificación de la enzima consta de 4 pasos (Fig. 1.6).

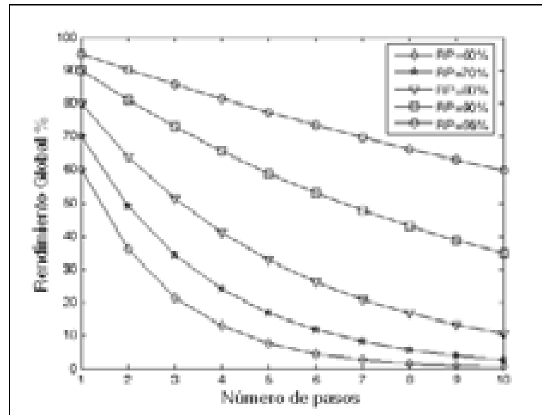


Figura 1.5: Representación gráfica del rendimiento global de un proceso de purificación de un producto biotecnológico en función del rendimiento por paso y el número de pasos. Fuente: Hearn y Anspach, 1990.

En la tabla siguiente se presenta la cantidad de enzima y de proteína total al final de cada paso.

Paso	**Proteína total** (g)	**Enzima total** (g)	**Fracción enzima** $\times 10^3$
Romp. celular	12.000	0.080	6.667
Precipitación	1.800	0.060	33.333
Inter. iónico	0.240	0.048	200.000
Cromat. gel	0.036	0.036	1000.000

Se pide: Obtener el factor de purificación de la enzima en cada paso, el rendimiento por paso y el rendimiento global.

Solución:

El factor de purificación, el rendimiento por paso y el rendimiento global del proceso se presentan junto con los datos del problema en la tabla siguiente:

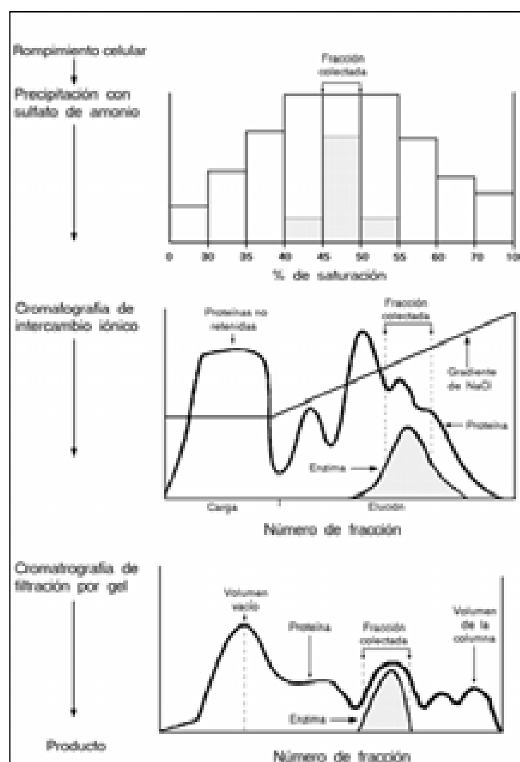


Figura 1.6: Proceso hipotético de cuatro pasos para la purificación de una enzima.

Paso	Prot. tot. (g)	Enzima tot. (g)	Fracción enz. $\times 10^3$	Factor de purific.	% Rendimiento Por etapa	% Rendimiento Global
Romp. celular	12.000	0.080	6.667	1	100	100
Precipitación	1.800	0.060	33.333	5	75	75
Inter. iónico	0.240	0.048	200.000	30	80	60
Cromat. gel	0.036	0.036	1000.000	150	75	45

a) El factor de purificación se obtiene mediante el cociente de la fracción de enzima en cada paso, entre la fracción de enzima inicial.

b) El rendimiento en cada paso está dado por el cociente de la cantidad de enzima total obtenida en cada paso, entre la cantidad total de enzima al inicio del paso.

c) El rendimiento global al final de cada paso está dado por el cociente de la cantidad de enzima total obtenida en ese paso entre la cantidad total de enzima inicial.

GMP

La obtención de un producto biotecnológico debe realizarse conforme a las prácticas de buena manufactura para la industria (GMP de sus siglas en inglés), para los métodos, instalaciones y controles utilizados para la fabricación, procesamiento, empaque o manejo de una sustancia, para asegurar que ésta cumpla con los requerimientos de acción segura, y que presente la identidad y fuerza, y cumpla con las características de calidad y pureza que pretende o represente tener (L K Biosciences, 2009).

Todos los procedimientos deben mantenerse dentro de los límites especificados en los reportes de validación de la empresa, para poder demostrar la reproducibilidad de la operación y la calidad del producto final. En el contexto de la bioseparaciones, los procesos de validación comprenden todos los pasos críticos del proceso, especialmente las operaciones con membranas y las operaciones cromatográficas, particularmente las empleadas para remover bacterias y virus contaminantes (Kalyanpur, 2002).

Instalaciones

Debido a que la mayoría de los bioprocesos requieren control microbiológico, las instalaciones deben ser diseñadas bajo las normas apropiadas (HVAC), con gradientes positivos de presión de aire y entradas seguras para el personal. Las operaciones secuenciales deben estar próximas una a la otra (proximidades de proceso) para minimizar tiempos y costos. Es recomendable la segregación de las etapas del bioproceso para prevenir la contaminación. El grado de segregación depende del número de productos de la planta.

1.4. Importancia Económica de las Bioseparaciones

La obtención de productos a partir de materiales biológicos generalmente requiere operaciones de bioseparación apropiadas que son costosas y pueden ser el factor limitante en el desarrollo del bioproceso (Rito-Palomares, 2008). Esto es debido principalmente a la baja concentración de producto en los caldos que entran al proceso de bioseparación y a la alta pureza requerida por la mayoría de los productos finales (Woodley *et al.*, 2008). Frecuentemente, la parte correspondiente a las bioseparaciones puede representar hasta un 60 % del costo total de producción sin considerar las materias primas (Kalk, 1986). Debido a lo anterior, existe una relación inversa entre el precio de venta de un producto biotecnológico y la concentración de éste en el caldo del biorreactor (Fig. 1.7). Es obvio que no sólo la concentración del producto en el fermentador determina el precio, también deben ser consideradas la escala, la productividad y el rendimiento global de la recuperación. Puede decirse entonces que el éxito comercial de un proceso biotecnológico depende en gran medida de la adecuada

selección del esquema de bioseparación, particularmente conforme el margen de utilidad (precio-costo) disminuye.

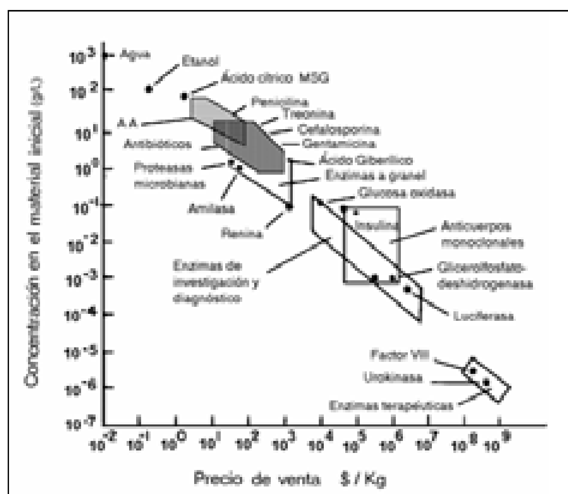


Figura 1.7: Relación entre la concentración inicial del producto en el caldo y el precio final de venta del producto. Fuente: Dwyer, 1984.

1.5. Comercialización del Bioproducto

El desarrollo sustentable de un proceso biotecnológico para la obtención de un producto de interés comprende varios aspectos, principalmente los ambientales y sociales relacionados con su impacto en la población, los económicos relacionados con el mercado y los técnicos que involucran el diseño del bioproceso. El estudio de mercado permite evaluar el potencial económico o social del proceso y es requisito indispensable para la formulación del proyecto a desarrollar. Por ejemplo, aún cuando la factibilidad técnica de un proceso dado pueda ser atractiva, el valor esperado del producto pudiera no justificarlo (Knight, 1990).

El tiempo de desarrollo de un producto biotecnológico es largo y puede comprender varios años en condiciones normales. Desde el punto de vista técnico el escalamiento del proceso pasa de la escala de laboratorio de mg, a la escala piloto de g y finalmente a la escala productiva de kg. Cuando es necesario, las pruebas del producto pasan por las fases clínicas I, II y III, paralelamente.

1.5.1. Desarrollo del Bioproceso

El diseño del bioproceso comprende todo el trabajo conceptual necesario que debe realizarse antes de la construcción o modificación de una planta de proceso. Este trabajo debe ser completo y cuidadoso, de tal manera que permita desarrollar y evaluar varios esquemas de operación con el propósito de aproximarse al diseño óptimo, bajo las restricciones presupuestales establecidas (Kelly, 1987). El diseño del bioproceso se realiza utilizando metodologías ingenieriles básicas como la *síntesis* y el *análisis* del proceso. La *síntesis* del proceso es la selección del esquema del proceso o diagrama de flujo que permita producir el producto de interés a un costo y calidad aceptables. El *análisis* del proceso consiste en evaluar y comparar diferentes esquemas obtenidos mediante la síntesis.

1.5.2. Diseño Interior

El concepto de diseño interior (*design in*) ha sido recomendado para ahorrar costos y tiempo en el escalamiento de un bioproceso (L K Biosciences, 2009). En este enfoque se propone considerar los aspectos relacionados con la seguridad, robustez, GMP, adaptabilidad, restricciones y acceso al mercado, desde los trabajos a escala de laboratorio. Partiendo de que la normatividad del proceso define al producto, en este enfoque se recomienda la integración de un paquete de transferencia tecnológica que comprenda la documentación de la justificación del proceso, el diagrama de flujo, la lista de materias primas, la descripción de las operaciones unitarias, las especificaciones y criterios de aceptación, los datos de lotes, el protocolo del proceso, la descripción de los métodos analíticos, el reporte de la caracterización del proceso y el reporte del desarrollo (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Conceptos para la integración de un paquete biotecnológico.

CONCEPTO	DESCRIPCIÓN
Diseño del proceso	Análisis ingenieril: escalabilidad, costos, rendimiento, facilidad de implementación, robustez
Línea celular	Descripción y status del banco de células
Materias primas	Lista y justificación
Diagrama de flujo	Diagrama y plan de muestreo
Operaciones unitarias	Documentación de corridas y protocolo
Sustancia	Pureza, composición, justificación y almacenamiento
Producto	Formulación, justificación y almacenamiento.
Control del proceso	Lista de análisis de control
Control de calidad	Especificaciones, criterios de aceptación y manual
Métodos analíticos	Demostración de la aplicabilidad de los métodos
Carac. proceso	Rangos aceptables probados y parámetros críticos
Pruebas del proceso	Datos de varios lotes de laboratorio

1.6. Tendencias en Bioseparaciones

En la era de la genómica funcional y la biología de sistemas, la obtención de bioproductos ha evolucionado cada vez más hacia el uso de estrategias más sistemáticas que las usadas previamente. El análisis integral del fenómeno celular está siendo utilizado para reprogramar células a nivel molecular para mejorar los bioprocesos. La manipulación genética y su análisis subsecuente, se ha combinado con estrategias ingenieriles para el diseño de estos bioprocesos (Fig. 1.8). El enfoque comprende una primera etapa para la obtención de la cepa modificada base, una segunda etapa de ingeniería de la cepa modificada base utilizando HTA (High throughput analysis) y simulación *in silico*, además de una tercera etapa de diseño del proceso fermentativo y las bioseparaciones (Park *et al.*, 2008). El enfoque HTA también está siendo utilizado en esta última etapa para la optimización de operaciones como la cromatografía (Wiendahl *et al.*, 2008).

La tecnología de análisis de proceso (PAT) ha sido recomendada por la FDA como un sistema para diseñar, analizar, y controlar el bioproceso mediante mediciones de atributos críticos de calidad y comportamiento de materias primas, materiales en proceso, y procesos; con el objetivo de asegurar la calidad final del producto (Känsäkoski *et al.*, 2006). Es importante hacer notar que el término *análisis* es general e incluye los análisis químicos, físicos, microbiológicos, matemáticos y de riesgo de manera integrada. El objetivo de la PAT es mejorar el entendimiento y control del proceso de fabricación, que es consistente con el objetivo de los actuales sistemas de control de calidad: *la calidad no se prueba en los productos, ésta debe ser inherente al producto o debe estar presente por diseño* (FDA, 2004).

En varios casos, este enfoque biológico combinado con estrategias ingenieriles de optimización ya ha producido un mejoramiento considerable de varios bioprocesos. Uno de los ejemplos más promisorios es la producción de anticuerpos terapéuticos en células de mamíferos donde se han alcanzado concentraciones de más de 10 g/L en el proceso fermentativo. Esta tendencia plantea nuevos retos en el diseño de las bioseparaciones para aprovechar las altas concentraciones obtenidas, ya que las operaciones convencionales como la cromatografía que se caracterizan por su baja capacidad volumétrica, es muy probable que se conviertan en cuello de botella de las bioseparaciones (Flaschel, 2008).

En este sentido, algunas operaciones tradicionales como la extracción y las operaciones híbridas como la cromatografía en columnas de membranas están siendo consideradas para cubrir este tipo de procesos (Gottschalk, 2008). En el caso de productos intracelulares, éstos demandan técnicas novedosas de liberación selectiva como una forma posible de mejorar la eficiencia de las bioseparaciones involucradas (Balasundaram *et al.*, 2009).

Las aplicaciones clínicas de los desarrollos biotecnológicos también impactarán los procesos de bioseparación. La tecnología de las células troncales requerirá métodos de cosecha apropiados para el procesamiento de este tipo de biomasa. Las vacunas de DNA y la terapia génica ya estimulan el desarrollo de bioseparaciones apropiadas, que presentan particularidades que las hacen diferentes a los esquemas de las proteínas (Haynes, 2004). En cuanto al proceso, los equipos

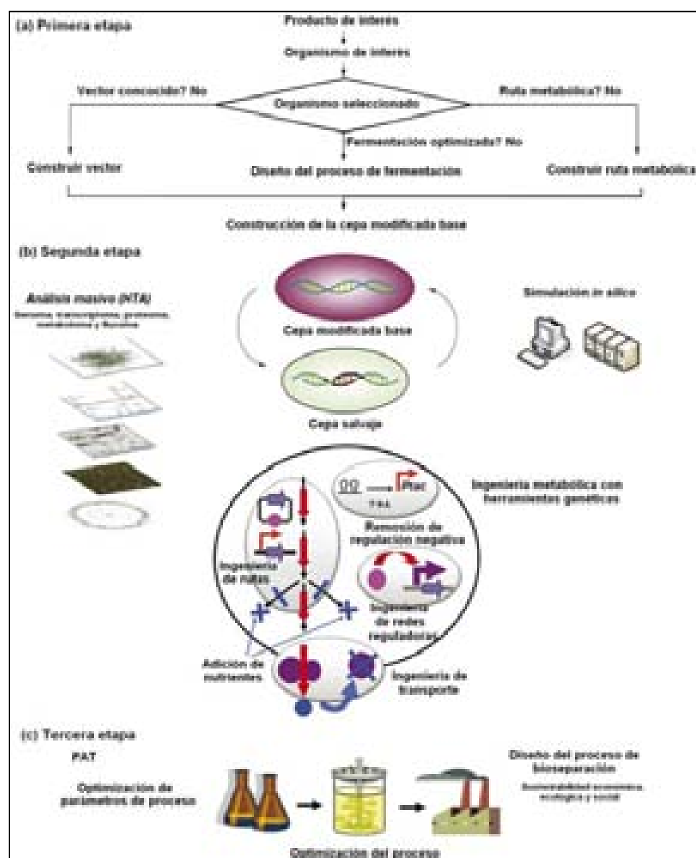


Figura 1.8: Desarrollo de nuevos bioprocesos. a) Obtención de la cepa modificada base, b) Ingeniería de la cepa modificada base utilizando HTA y simulación *in silico* y c) Diseño de la etapa fermentativa y de bioseparaciones. Adaptada de Park *et al.*, 2008.

y accesorios desechables representan una alternativa cada vez más económica en las bioseparaciones debido al ahorro en costos de limpieza y de validación de los procesos (Rao *et al.*, 2009).

Hoy, los bioprocesos bien establecidos pueden utilizar modelos matemáticos en la optimización y simplificación de la validación de operaciones de bioseparación como la cromatografía. Este enfoque será extendido a más procesos y procedimientos experimentales (Asenjo y Andrews, 2008). La simulación será cada vez más utilizada en el desarrollo inicial de un concepto, en el diseño del proceso o en la operación de una planta. Esto involucra la elaboración de diagramas de flujo, balances de masa y energía, dimensionamiento de equipo y costos de capital y operación.

Varios paquetes computacionales comerciales están disponibles para realizar estas tareas como SuperPro Designer y ASPEN. Algunos desarrollos recientes sobre el uso de modelos en bioprocesos son del área de dinámica computacional de fluidos (CFD), principalmente para el estudio de tiempos de residencia y mezclado en equipo de proceso. El comportamiento de algunos esquemas de bioseparación frecuentemente es muy dependiente de algunas operaciones unitarias claves como la extracción y la cromatografía. La modelación y simulación de estas operaciones puede ayudar a reducir tiempos y costos en el desarrollo y operación de los bioprocesos. Para realizar este tipo de simulaciones es frecuente utilizar paquetes y programas como Matlab, Mathcad y Fortran (Gosling, 2005).

1.7. Sumario

Los procesos de bioseparación involucran operaciones de recuperación, concentración, purificación y acabado de productos provenientes del biorreactor. Las bioseparaciones comprenden todos los tratamientos que requiere el caldo de cultivo para obtener un producto biotecnológico en las condiciones de pureza y actividad requeridas. La sustentabilidad de los procesos biotecnológicos depende en gran medida de las operaciones de bioseparación que involucran, de tal manera que la correcta selección y diseño de estas operaciones tiene un fuerte impacto en el éxito del proceso.

1.8. Problemas

1.1. Análisis comparativo de esquemas de bioseparación. Efectuar un análisis comparativo, en relación a las operaciones de separación que utilizan, de los procesos para la producción de ácido cítrico, penicilina e insulina.

1.2. Cálculo de párametros del comportamiento de un bioproceso. Un proceso para la recuperación de hidroxibutirato deshidrogenasa consta de tres pasos: Un rompimiento de las células para liberar la enzima intracelular, seguido de dos pasos de adsorción/desorción por afinidad. En la tabla siguiente se presentan los datos obtenidos de actividad de enzima y proteína total al final de cada paso.

Se pide: Calcular la actividad específica, el factor de purificación y el % de rendimiento.

Paso	Actividad Total (Unidades)	Proteína Total (mg)	A Esp.	F Purif.	Rend.
Rompimiento	6,860	76,200			
Ads/Des (1)	6,800	2,200			
Ads/Des (2)	5,380	267			

1.3. Análisis de purificación. Completar la siguiente tabla relacionada con la purificación de una enzima:

Material	Vol. ml	Conc. prot. mg/ml	Prot. total mg	Act. enzim. U/ml	Act. total U	Act. esp. U/mg	Rend. Etapa	Rend. Total	Fac. purif.
Extracto	1500	12.0			20,000				
1er. paso	550	11.0			16,940				
2do paso	125	4.5			14,387				

1.4. Precio y costo. En un proceso biotecnológico que se encuentra en desarrollo para producir una enzima, se obtiene una concentración de 0.1 mg/ml de la enzima en el caldo inicial. A los proyectos de la empresa se les exige un margen sobre ventas del 50 % (MSV = Precio - Costo).

Se pide: Estimar el costo de producción máximo del producto utilizando la Figura 1.7.

1.5. Esquema de bioseparación de pDNA. Se requiere diseñar un proceso para producir plásmidos de DNA (pDNA) purificados, a partir de cultivos de *E. coli*. Los pDNA se producen dentro de las células, en forma de DNA circular cerrado superenrollado, son de tamaño mucho menor al genoma bacteriano,

pero mucho más grandes que las proteínas. Su peso molecular es de 3,000 kDa y a un $pH = 8.0$ su carga externa es muy negativa debido a los grupos fosfatos.

Para la producción del plásmido se cuenta con los siguientes equipos:

a) Una columna de inercambio catiónico.

b) Una columna de intercambio aniónico.

c) Una centrífuga para cosechar células.

d) Una columna cromatográfica de SEC que retiene moléculas de peso molecular menor a 100 kDa.

e) Un equipo de choque osmótico para romper células.

f) Una unidad de ultrafiltración.

Se pide: Diseñar un esquema de bioseparación del plásmido.

1.6 Rendimiento. En una operación de ultrafiltración/diafiltración se procesan 120 L de una solución eluída de una columna de Q Sefarosa, que tiene una concentración de proteína de 1.9 mg/mL. La solución concentrada (retenido) ocupa un volumen de 30 L y tiene una concentración de 7.4 mg/mL.

Se pide: Calcular el rendimiento de la etapa.

Resp. 97 %

1.9. Bibliografía

Ainsworth, S.J. **2005**. Biopharmaceuticals. *C&EN*. 83, 21-29.

Asenjo, J.A.; Andrews, B.A. **2008.** Challenges and trends in bioseparations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 117–120.

Balasundaram B.; Sue Harrison , S.; Bracewell, D.G. **2009.** Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends Biotechnol.* 27, 477-485.

Bujurstrom, E. **1985**. Biotechnology. *Chem. Eng.* 18, 126–158.

Cooney, C. L. **1990**. *Separations for biotechnology.* Trends in Biotechnology. 8, 338-340.

Datar, R.; Rosén C.G. 1**990**. Downstream process economics. En: *Separations Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York. 741-793.

Datar, R.V.; Cartwright, T.; Rosén, C.G. **1993**. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: A case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technolog*y. 11, 349-357.

Demain, A.L. **2007**. The business of biotechnology. *Ind. Biotech.* 3, 269-283.

Dwyer, J. **1984**. Scaling up bioproduct separation with high performance liquid chromatography. *Biotechnology.* 2, 957-964.

FDA. **2004**. Guidance for Industry PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. US Food and Drug Administration.

Ferrer-Miralles, N.; Domingo-Espín, J.; Corchero, J.L.; Vázquez, E.; Villaverde, A. **2009**. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories.* 8, 1-8.

Flaschel, E**. 2008.** Can we expect a breakthrough in downstream processing of biotechnological products in the near future?. *Chem. Eng. Technol.* 31, 809–809.

Gosling, I. **2005.** Process simulation and modeling for industrial bioprocessing. *Ind. Biotech.* 1, 106-109.

Gottschalk, U. **2008**. Bioseparation in antibody manufacturing: The good, the bad and the ugly. *Biotechnol. Prog.* 24, 496-503.

Haynes, C. **2004**. The importance of bioseparations: giving credit where credit is due. *Biotech. Bioeng.* 87, 257-258.

Hearn, M.T.; Anspach, B. **1990**. Chemical, physical and biochemical concepts in isolation and purification of proteins. En: *Separations Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York. 17-63.

Heinzle, E.; Biwer, A.; Cooney, C.L. **2006.** *Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment.* Wiley-VCH. Weinheim, Germany. 227-228.

Kalk, J.P.; Langlykee, A.F. **1986**. Cost estimation for biotechnology projects. En: *Industrial Microbiology and Biotechnology.* Demain, A.L.; Solomon, N. (Eds.). American Society for Microbiology. New York. 363-384.

Känsäkoski, M.; Kurkinen, M.; von Weymarn, N.; Niemelä, P. **2006**. Process analytical technology (PAT) needs and applications in the bioprocess industry. Review. VTT. Technical Research Centre of Finland.

Kalyanpur, M. **2002.** Downstream processing in the biotechnology industry. *Molec. Biotechnol.* 22, 87-98.

Kelly, R.M. **1987**. General processing considerations. En: *Handbook of Separation Process Technology.* Rousseau, R. W. (Ed.). John Wiley and Sons. New York. 4, 197-225.

Knight, P. **1990**. Bioseparations: Media and modes. *Biotechnology.* 8, 200-201.

Ladisch, M.R.; Kohmann, K.L. **1992**. Recombinant human insulin. *Biotechnol. Prog.* 8, 469-478.

L K Biosciences. **2009**. The L K Process Guide. http://www.lk-processguide.com

Null, H. R. **1987**. Selection of a separation process. En: *Handbook of Separation Process Technology.* Rousseau, R.W. (Ed.). John Wiley and Sons. New York. 982-995.

OECD. **2005**. A framework for biotechnology statistics. http://www.oecd.org

Park, J.H.; Lee, S.Y.; Kim, T.Y.; Kim, H.U. **2008.** Application of systems biology for bioprocess development. *Trends in Biotechnology* 26, 404-412.

Rao, G.; Moreira, A.; Brorson, K. **2009**. Disposable bioprocessing: The future has arrived. *Biotech. Bioeng.* 102, 348-356.

Rito-Palomares, M. **2008**. Bioseparation: The limiting step in bioprocess development. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 115–116.

Tejeda-Mansir, A.; Montesinos R. M. **2008**. Upstream processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications. *Recent Patents on Biotechnology* 2, 156-172.

Wang, D.I.C. **1988**. Biotechnology: Status and perspectives. *AIChE.* 84, 1-21.

Wiendahl, M.; Wierling, P.S.; Nielsen, J.; Christensen, D.F.; Krarup, J.; Staby, A.; Hubbuch, J. **2008**. High throughput screening for the design and optimization of chromatographic processes – miniaturization, automation and parallelization of breakthrough and elution studies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 31, 893–903.

Woodley, J.M.; Bisschops, M.; Straathof A. J.J.; Ottens, M. **2008.** Future directions for in-situ product removal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 121–123.

Capítulo 2

Síntesis del Bioproceso

2.1. Introducción

El trabajo que se realiza para seleccionar la secuencia de operaciones (diagrama de flujo) de un bioproceso para transformar una serie de materias primas en productos, se llama *síntesis de proceso*. El diagrama de flujo generalmente se obtiene combinando el conocimiento fundamental de cada operación, plasmado en modelos y simulación, con experimentos a nivel laboratorio, cuidando de utilizar operaciones escalables y reactivos que puedan ser utilizados comercialmente. Actualmente, es necesario diseñar los bioprocesos bajo criterios de sustentabilidad económica, ecológica y social, esto estimula el éxito del bioprocesos en el largo plazo y ayuda a cumplir con las regulaciones establecidas y futuras.

En este capítulo, en la sección 2.2 se presenta la metodología general del diseño de bioprocesos y los principales aspectos técnicos y normativos a considerar en este tipo de estudios. Los equipos más utilizados para realizar dichas operaciones se describen en la sección 2.3. Las metodologías utilizadas para la selección apropiada de la secuencia de bioseparaciones de un bioproceso y su evaluación se establecen en la sección 2.4.

2.2. Fundamentos

El diseño de un proceso comprende todo el trabajo conceptual que es necesario realizar antes de construir una planta productiva. Para desarrollar un bioproceso eficientemente es necesario seleccionar las operaciones más apropiadas y combinarlas de manera lógica para obtener el producto bajo las especificaciones necesarias, en un mínimo de pasos (Nfor *et al.*, 2008). Esta sección trata de dos aspectos del diseño de los bioprocesos:

- El enfoque para el diseño.
- Consideraciones técnicas de diseño.

2.2.1. Enfoque de Diseño

El diseño del bioproceso se realiza combinando herramientas de diseño con un enfoque de diseño apropiado (Fig. 2.1). Una vez definido el problema de diseño, la información obtenida mediante experimentación y de la literatura permitirá caracterizar las corrientes para realizar los estudios de modelación y los balances de materia. Mediante la metodología de síntesis y análisis se desarrolla y selecciona el diagrama de flujo del bioproceso. A través de experimentación adicional es posible optimizar el bioproceso, para concluir con el diseño detallado del mismo.

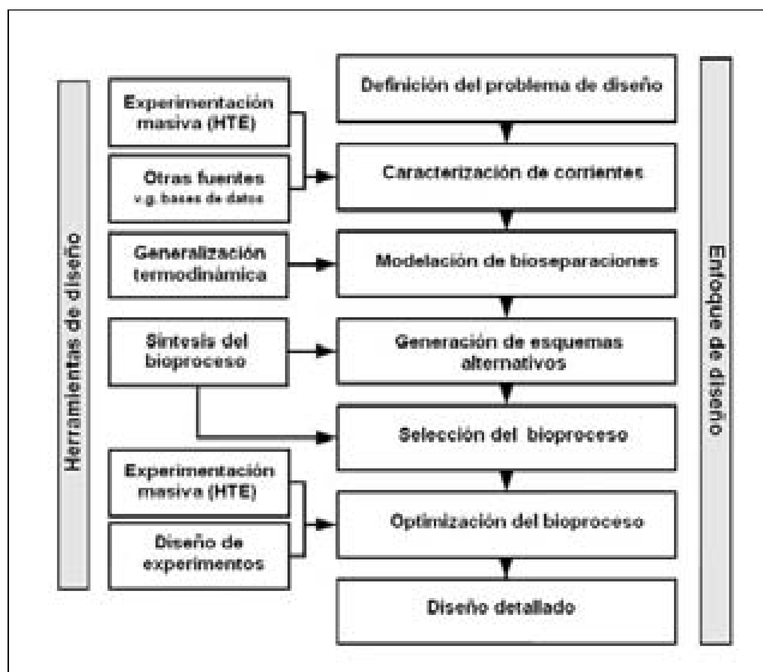


Figura 2.1: Enfoque teórico experimental para el diseño de un bioproceso.

2.2.2. Consideraciones Técnicas de Diseño

En el diseño de un bioproceso es necesario considerar las características técnicas básicas del mismo como: a) la secuencia de operaciones unitarias del bioproceso, b) la escala del bioproceso, c) el número de etapas por operación unitaria y d) los procesos unitarios.

Operaciones unitarias de separación y su secuencia

Una vez definido el producto (o productos) que se desea obtener, así como su concentración, pureza, actividad y la recuperación deseada, el siguiente paso es determinar qué operaciones son capaces de realizar la producción y la separación del bioproducto. Esto se plasma en el diagrama de flujo del bioproceso que contiene las operaciones unitarias del mismo como esterilización, fermentación, filtración, extracción y cristalización.

Escala de operación

Frecuentemente la escala de operación o volumen de producción, es el factor económico determinante en la selección entre bioprocesos de bioseparación alternativos. Cualquier proceso de bioseparación que se escoja, deberá ser compatible con la escala industrial a la cual se va a diseñar. Esto es importante porque varios procesos desarrollados en el laboratorio no tienen su contraparte industrial. Muchas operaciones de bioseparación tienen un límite respecto de la capacidad máxima que pueden manejar y esto limita la escala de producción para la cual esa operación puede ser considerada. En algunos casos, este límite superior se debe a una restricción impuesta por un fenómeno físico inherente a la operación de separación, mientras que en otros casos el límite superior se debe simplemente a las limitaciones que ofrece la fabricación de equipo comercial. En la Tabla 2.1 se pueden observar las capacidades máximas en una sola etapa de algunas operaciones de separación.

Tabla 2.1: Capacidades máximas por operación de bioseparación.

Operación de separación	Límite comercial por operación simple
Destilación	Sin límite
Extracción	Sin límite
Cristalización	10-70 $\times 10^6$ kg/año
Adsorción	Sin límite
Ósmosis inversa	0.45 $\times 10^6$ kg/año flujo de agua por módulo, con varios módulos por unidad
Ultrafiltración	0.45 $\times 10^6$ kg/año deflujo de agua por módulo, con varios módulos por unidad
Intercambio iónico	450 $\times 10^6$ kg/año de flujo de agua
Electrodiálisis	0.45 $\times 10^6$ kg/año de flujo de agua
Electroforesis	1000 kg/año de producto
Cromatografía	0.99 $\times 10^6$ kg/año de líquido
Filtración por gel	100 kg/año de producto

Fuente: Null, 1987.

Cada operación de separación tiene en sí misma una determinada confiabilidad que es producto de la experiencia y conocimiento de la misma. Así, se tiene que la destilación es la operación más confiable de los procesos de separación por el conocimiento que de ella se tiene. La electroforesis, en cambio, es una operación que se realiza a pequeña escala, entonces la única forma de tener confiabilidad a gran escala es usando múltiples unidades en arreglo paralelo.

Debido a consideraciones de confiabilidad del diseño, puede ser necesaria una planta piloto para probar la operación integrada del bioproceso. En tal caso, todas las operaciones deben ser incluidas en la planta piloto aún cuando no se requieran pruebas individuales de confiabilidad de cada una de ellas.

Número de etapas por operación unitaria

Otra variable importante en la selección de un proceso de bioseparación, es el número de etapas de contacto que se realizan por operación. En la mayoría de los casos una operación de una sola etapa es más económica que una operación de etapas múltiples. Las operaciones de bioseparación tienen diferente habilidad para realizar una separación en una sola etapa. Por ejemplo, la destilación es una operación capaz de separar una mezcla binaria en una sola columna, siempre y cuando no haya formación de mezclas azeotrópicas entre los componentes que serán separados. La extracción requiere de al menos dos etapas de contacto para separar un flujo de alimentación en dos corrientes y obtener el producto en condiciones aceptables.

Teóricamente la ultrafiltración puede separar dos solutos de alto peso molecular si la diferencia en tamaño molecular es del orden de 10; en caso de que esto no sea así, la separación requiere varias etapas. En el caso de las operaciones de electroforesis, cromatografía, y la filtración en gel, dado que separan el producto por dilución, requieren etapas de concentración posteriores.

Procesos unitarios

Un proceso unitario es el conjunto de operaciones que se realizan secuencialmente en un equipo. Por ejemplo, la adsorción se realiza mediante un proceso unitario que consiste en 4 operaciones: la adsorción, el lavado, la elución y la regeneración.

Ejemplo 2.1. Enfoque en el escalamiento

En el desarrollo de un bioproceso se estima un volumen de lecho (CV) de una columna cromatográfica a escala industrial de CV = 820 L. La elución de la columna se realizará con 2 CV de buffer 1.0 M de $(NH_4)_2SO_4$. Por cada lote de fermentación la columna se operará 5 ciclos y se producirán 40 lotes por año.

Se pide calcular:

a) El volumen de buffer de elución requerido anualmente.

b) La masa de sal requerida anualmente.

c) El ahorro volumétrico anual en buffer si en el desarrollo del bioproceso se logra una diminución del 10 % en el volumen de elución.

d) El ahorro másico anual en sal si en el desarrollo del proceso se logra además una disminución del 10 % en la concentración de buffer de elución.

Solución:

a)

$$\text{Volumen de buffer } = 820\ \frac{\text{L}}{\text{CV}} \times 2\ \frac{\text{CV}}{\text{Ciclo}} \times 5\ \frac{\text{Ciclo}}{\text{Lote}} \times 40\ \frac{\text{Lote}}{\text{año}} = 328 \times 10^3\ \text{L}$$

b)

$$\text{Masa de sal} = 328 \times 10^3\ \text{L} \times 1.0\ \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 132.14\ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \frac{\text{kg}}{10^3\ \text{g}} = 43,342\ \text{kg}$$

c)

$$\text{Ahorro volumen } = 328 \times 10^3\ \text{L} \times \left(\frac{2-1.8}{2}\right) = 32.8 \times 10^3\ \text{L}$$

d)

$$\text{Masa de sal} = 295.2 \times 10^3\ \text{L} \times 0.9\ \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 132.14\ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \frac{\text{kg}}{10^3\ \text{g}} = 35,107\ \text{kg}$$

$$\text{Ahorro de sal} = (43,342 - 35,107)\ \text{kg} = 8,235\ \text{kg}$$

2.3. Equipo

Parte importante en la selección de un proceso biotecnológico consiste en determinar el equipo necesario para realizar una determinada operación. Varios tipos de equipos pueden ser empleados para una misma operación y la selección depende en gran medida del tipo de producto que va a obtenerse. A continuación se describen los principales equipos que se utilizan en cada una de las etapas de las bioseparaciones.

2.3.1. Recuperación

La recuperación generalmente hace uso de equipos de remoción de insolubles y de rompimiento celular.

Remoción de insolubles

Con frecuencia se usan sistemas de filtración al vacío, sistemas de filtración por lotes, así como centrífugas tubulares, de discos con descarga intermitente o de canasta. Los sistemas de microfiltración son cada vez más utilizados en estas operaciónes,

Rompimiento celular

En esta etapa los equipos que más se manejan son los homogeneizadores y los molinos de perlas. La lisis alcalina en tanques agitados o sistemas tubulares ha sido considerada en varios desarrollos.

2.3.2. Concentración

En la concentración del producto se emplean extractores que pueden funcionar en forma continua o intermitente, así como también lechos empacados con diversos tipos de adsorbentes. La precipitación con sales o solventes en tanques agitados también es empleada en este nivel. Los sistemas de ultrafiltración y diálisis participan cada vez más en estas etapas.

2.3.3. Purificación

En esta etapa se utilizan diversos sistemas cromatográficos que se traducen en la utilización desde equipos muy sencillos como puede ser una simple columna, hasta equipos muy sofisticados como los utilizados en cromatografía líquida de alta resolución. También son utilizados en esta etapa sistemas de electroforesis.

2.3.4. Acabado

En la etapa de acabado, dependiendo de la presentación con que se va a lanzar el producto al mercado, pueden utilizarse liofilizadores, secadores y cristalizadores.

2.4. Diseño

El diseño de un bioproceso comprende diversas actividades basadas en la experiencia, la teoría y el apoyo computacional disponible. Entre estas actividades podemos destacar las siguientes:

Síntesis: establecimiento de las operaciones del proceso o diagrama de flujo.

Análisis: modelación y establecimiento de los valores de las variables del proceso.

Evaluación: económica, ambiental y social.

2.4.1. Síntesis del Bioproceso

El éxito de un diseño depende fuertemente de la síntesis del bioproceso ya que las tres actividades restantes: análisis, evaluación y optimización, se derivan del diagrama de flujo seleccionado. Para tratar de automatizar esta tarea se han desarrollado varias metodologías computacionales basadas en método algorítmicos (Prokopakis y Asenjo, 1990) o bien en sistemas expertos (Asenjo y Andrews

2008). Sin embargo, en la práctica los esquemas de bioseparación se obtienen mediante reglas derivadas de la experiencia conocidas como heurísticas.

Método heurístico

El método heurístico consiste en la práctica normal de diseño, que se inicia definiendo un caso base, que representa el juicio cualitativo del ingeniero de diseño y presupone ser el bioproceso de separación más económico que pueda ser desarrollado dentro de las restricciones que en tiempo y dinero tiene el proyecto (Null, 1987).

Una vez que el caso base ha sido seleccionado, el diseñador de proceso determinará los costos de operación y capital con el mayor detalle posible. Cuando el caso base ha sido evaluado, se hace un juicio sobre el más próximo proceso económicamente competitivo. El proceso alternativo se evalúa con las mismas restricciones que el caso base. Si el proceso modificado tiene costos de operación y capital más bajos, entonces éste nos lleva a un nuevo caso base de diseño. Este nuevo caso base vuelve a probarse hasta encontrar un caso base óptimo.

Reglas generales del método heurístico El método heurístico trata de limitar las alternativas posibles para un bioproceso usando reglas desarrolladas a través de diseños previos y la experiencia. Al basarse en la experiencia, el sentido común y la intuición del ingeniero, la aproximación heurística no garantiza la solución óptima. Aún así, estos métodos han probado ser una herramienta valiosa en la optimización de la estructura del bioproceso. Algunas de estas reglas heurísticas son generales y aplicables para la síntesis de procesos de bioseparación. Cinco de tales reglas heurísticas son (Petrides *et al.*, 1989):

1. Remover primero la impureza más abundante.
2. Remover primero la impureza que sea más fácil.
3. Hacer las separaciones más caras y difíciles al final.
4. Seleccionar el esquema de bioproceso que permita aprovechar al máximo las diferencias entre las propiedades del producto y los contaminantes.
5. Seleccionar y secuenciar procesos que exploten diferentes fuerzas impulsoras de la bioseparación.

Reglas específicas del método heurístico Existen reglas heurísticas más específicas que las mencionadas anteriormente, como las usadas en el diseño de bioprocesos de purificación de proteínas a gran escala:

1. Si el producto es intracelular, se requiere romper la célula.
2. Si la célula cultivada es de mamífero, el producto es extracelular.
3. Si el rompimiento de la célula se lleva a cabo por métodos mecánicos, se requiere precipitar los ácidos nucleicos.

4. Si la concentración de la proteína total al final de la recuperación y antes de la purificación, es menor que 60 g/L, se requiere concentrar el producto.

5. Si la alimentación para la purificación por cromatografía no es un caldo claro, se requiere un pretratamiento.

6. Si uno o dos pasos de intercambio iónico producen una pureza similar a la de cromatografía de afinidad, debe escogerse el intercambio iónico.

7. La filtración en gel se puede utilizar como una etapa de separación intermedia sólo para la eliminación de sales.

8. La filtración por gel se puede utilizar como un paso de acabado sólo para separar fracciones proteicas.

Este tipo de reglas son utilizadas conjuntamente con otras aún más específicas, en el desarrollo de bases de conocimientos para sistemas expertos (Prokopakis y Asenjo, 1990).

Aproximación heurística para la selección de un proceso de biosepa- ración.

Se presenta en esta sección una aproximación heurística de la síntesis de un proceso de bioseparación de materiales biológicos típico (Petrides *et al.*, 1989). El primer paso en la síntesis de un proceso, consiste en desarrollar un diagrama de bloques de sus principales etapas. Posteriormente, se seleccionan para cada etapa las operaciones alternativas posibles. El desarrollo del diagrama de bloques está basado en la estructura general que se presenta en la Figura 2.2. Para cada tipo de producto (intracelular o extracelular) existen varias rutas posibles. La selección de la ruta y la operación específica en cada etapa se basa en las propiedades del producto, las impurezas y el tipo de célula; así como en las cinco reglas heurísticas descritas anteriormente.

Etapa de recuperación : Productos intracelulares En el desarrollo de un diagrama de bloques para un nuevo bioproceso, es necesario distinguir entre productos extracelulares e intracelulares. El procesamiento de los productos extracelulares es comparativamente más fácil de realizar que la de los productos intracelulares. En el caso de los productos intracelulares, las operaciones que se utilizan son las siguientes:

Cosecha de células El primer paso en un proceso para la recuperación de productos intracelulares es la cosecha de células. Remover primero el líquido extracelular, está en completa concordancia con la primera regla heurística: remover primero la impureza más abundante. Como se establece en la Figura 2.2, la centrifugación y la filtración por membrana son las únicas técnicas usadas para cosecha de células a gran escala. La centrifugación tiene ventajas para microorganismos grandes (diámetro mayor que 2 μm y densidad mayor que $1,030$ kg/m^3 como las levaduras).

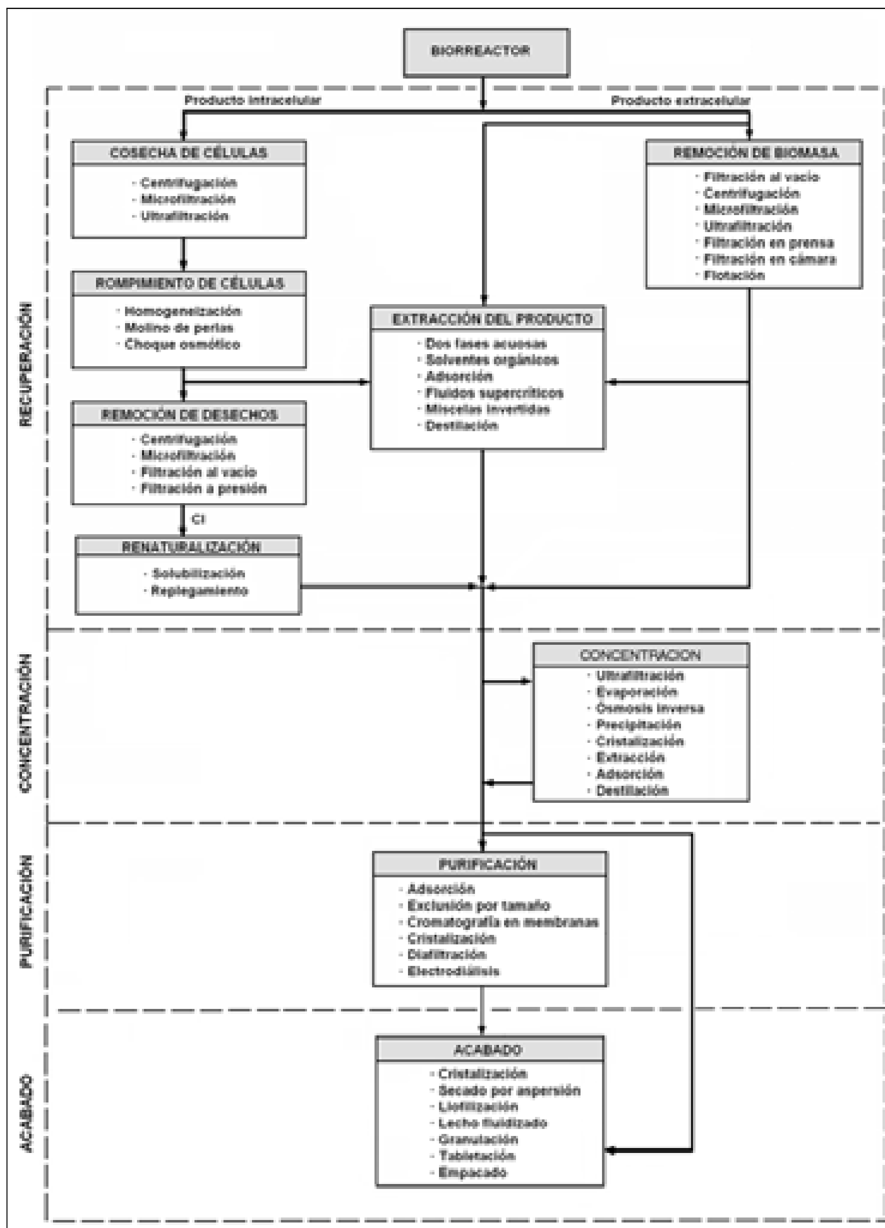


Figura 2.2: Diagrama de bloques general de un proceso de bioseparación con las etapas características. Fuente: Petrides *et al.*, 1989.

Para microorganismos más pequeños pueden usarse técnicas de coagulación para aumentar el tamaño de la partícula que sedimentará. La filtración por membrana tiene ventajas para cosechar células pequeñas y ligeras como la de *E. coli*. Cuando el flujo es mayor que 20 L/m^2-h, la filtración por membrana es la que produce mejores resultados. Otra ventaja de la filtración por membrana es la recuperación del producto. Con la centrifugación siempre se pierden de 1 a 5 % de las células. Con filtración por membrana se recuperan todas las células, siempre que no se presente rompimiento o lisis.

Rompimiento de células Con frecuencia el segundo paso en la obtención de productos intracelulares es el rompimiento de la célula. El rompimiento de bacterias y levaduras es realizado por homogeneizadores a alta presión o con molinos de perlas. Para altas capacidades (varios m^3/h) solamente se puede disponer de homogeneizadores. Para el rompimiento celular, también se utilizan métodos químicos. Dentro de éstos se puede destacar el uso de la digestión enzimática para liberar proteína intracelular de bacterias gram-positivas, la disolución lipídica para el caso de bacterias gram-negativas, así como el choque osmótico que puede utilizarse para liberar proteínas del espacio periplásmico.

En el caso de producción de plásmidos se utiliza frecuentemente la lisis alcalina. Antes de la ruptura frecuentemente se diluye la corriente a un 5-10 % con buffer para minimizar la desnaturalización del producto. En el caso de bacterias conteniendo CI, se requieren varios pasos por el homogeneizador a 500-1000 bars, para lograr el rompimiento y liberación de los CI.

Remoción de desechos celulares Una vez que la célula se rompe y el producto es liberado, los desechos son eliminados por medio de una o varias operaciones como: centrifugación, microfiltración o filtración por presión.

Cuando el producto es soluble, éste es recuperado en la fase ligera de una centrífuga o en el filtrado de un filtro. Las centrífugas son eficientes para la separación de partículas grandes como los restos celulares, de tal manera que cuando se usen para este efecto, deben ser acompañadas de una operación de filtrado para eliminar las partículas más pequeñas; debido a que éstas pueden ocasionar problemas en etapas de bioseparación posteriores, principalmente en las de cromatografía. Cuando se usan microfiltros para remover los desechos, se requiere posteriormente realizar una diafiltración.

Cuando el producto es insoluble (por ejemplo los cuerpos de inclusión), debe ser separado primero de otras partículas y posteriormente tratado para que adquiera su forma activa. Este es un problema común de muchas proteínas eucarióticas producidas por microorganismos procariotes, por ejemplo la hormona de crecimiento producida por *E. coli*. Las proteínas recombinantes forman cuerpos de inclusión dentro de la célula huésped. Estos pueden ser separados de los restos celulares con una centrífuga de discos. La separación es realizada por resuspensión y recentrifugación de la fase pesada en 2 o 3 pasos. Posteriormente se pueden usar detergentes para remover otros contaminantes.

La separación del producto de los desechos puede realizarse ya sea por ad-

sorción o por extracción con solventes orgánicos o con algunas soluciones de polímeros. Los sistemas de dos fases acuosas han sido aplicados para la recuperación de proteínas.

La separación del producto de los desechos y su concentración simultánea puede ser alcanzada utilizando técnicas de adsorción ya sea con adsorbentes de afinidad o de intercambio iónico. En este proceso, las células rotas y el producto son mezclados en un tanque agitado con el adsorbente. Posteriormente se realiza un lavado en el cual muchos de los desechos y contaminantes son eliminados. La adsorción en lechos expandidos también se ha utilizado recientemente para separar proteínas de los restos celulares.

Renaturalización Las proteínas eucarióticas producidas por organismos procarióticos, frecuentemente forman cuerpos de inclusión en la célula recombinante. Estos cuerpos de inclusión pueden ser solubilizados mediante el uso de sales y agentes reductores. Después que la proteína desnaturalizada es solubilizada, se eliminan los solubilizantes utilizando cromatografía o diafiltración. Al final se obtiene una solución de proteína diluida.

Etapa de recuperación : Productos extracelulares La eliminación de biomasa es el primer paso que se realiza en un proceso de bioseparación cuando el producto es extracelular. Este paso se ajusta a la segunda regla heurística: remover primero la impureza que sea más fácil. En esta operación los equipos más empleados son: los filtros al vacío, la centrífuga de discos, la centrífuga decantadora, los filtros prensa, los filtros con membranas y la flotación. Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas según el tipo de producto y tipo de célula, haciendo de la selección un problema difícil. No hay una alternativa única para todos los productos.

Etapa de concentración Al final de la etapa de recuperación el producto se encuentra diluido y es necesario concentrarlo mediante operaciones como: ultrafiltración, extracción, ósmosis inversa, evaporación, precipitación y destilación.

Ultrafiltración Es una operación usada ampliamente para la concentración de proteínas. La membrana se selecciona para evitar el paso del producto y permitir el paso de las impurezas. La presión de operación típica varía entre 0.2 y 0.5 MPa y el flujo promedio entre 20 y 50 L/m^2-h.

Extracción La extracción con solventes es una operación ampliamente usada en la concentración de productos biotecnológicos, particularmente en la obtención de antibióticos. Se requiere que el coeficiente de partición del sistema sea alto para poder llevar a cabo la concentración del producto en el menor número de etapas de contacto.

Ósmosis inversa Se usan unidades con membranas de tamaño de poro pequeño para la concentración de soluciones de productos con bajo peso molecular como aminoácidos y antibióticos. Operan a altas presiones (4 a 6 MPa) y a bajas temperaturas.

Evaporación Se utilizan evaporadores de películas delgadas los cuales operan a bajas temperaturas (40-50 ^{o}C) al vacío. Estas unidades compiten en el mercado con la ultrafiltración y la ósmosis inversa para la concentración de compuestos tanto de alto como de bajo peso molecular.

Precipitación Es una operación usada para concentración y purificación. Comúnmente se usan sales, solventes y polímeros para la precipitación selectiva de compuestos de interés. La precipitación es usada para remover contaminantes.

Destilación En los procesos de bioseparación esta operación se utiliza generalmente para la recuperación de solventes orgánicos como etanol y ácido acético.

Etapa de purificación Las operaciones para la purificación final dependen fuertemente de la pureza requerida del producto, distinguiéndose los productos farmacéuticos por su alta pureza en comparación a la de los productos industriales. Para productos de pureza relativamente baja como las enzimas para detergentes, la operación de purificación final consiste sólo en la eliminación del solvente. Para productos de alta pureza, las operaciones de purificación finales son normalmente la cromatografía y la ultrafiltración.

Cromatografía Es una operación que se realiza al final de un proceso, en concordancia con la reglas heurísticas: hacer las separaciones más difíciles y caras al final. Existen diferentes tipos de cromatografía como la de intercambio iónico, la de filtración por gel y la de afinidad, entre otras. Normalmente se requiere de una secuencia de varias operaciones cromatográficas para alcanzar la pureza deseada del producto. Para la selección de la secuencia de estas operaciones deben observarse la cuarta y quinta regla heurísticas: seleccionar el esquema de bioproceso que permita aprovechar al máximo las diferencias entre las propiedades del producto y los contaminantes; seleccionar y secuenciar procesos que exploten diferentes fuerzas impulsoras de la bioseparación. Los principales tipos de cromatografías son los siguientes:

1. Cromatografía de filtración en gel (SEC). Este tipo de cromatografía separa moléculas con base a su tamaño molecular; tiene dos aplicaciones principales: remoción de pequeñas moléculas como sales y remoción de proteínas contaminantes del producto. En el fraccionamiento de proteínas, la filtración por gel es lenta comparada con otras técnicas cromatográficas.

2. Cromatografía de intercambio iónico. Esta separación se basa en la diferencia de la carga molecular de las biomoléculas. Puesto que la carga depende

del pH y la fuerza iónica, cualquier anión o catión en un soporte puede ser usado para realizar la separación. En la práctica sin embargo, la selección normalmente está determinada por el pH al cual es estable el producto que se desea purificar.

3. Cromatografía de afinidad. Las separaciones por afinidad o reconocimiento molecular, están basadas en las interacciones específicas entre biomoléculas. Es una operación apropiada en cualquier etapa de la purificación del producto y particularmente lo es para el manejo de grandes volúmenes de material con baja concentración de producto y gran cantidad de contaminantes. Es una operación altamente eficiente (más del 90 %). Su limitante es el alto costo de los materiales (ligandos) involucrados.

Ultrafiltración La ultrafiltración es comúnmente utilizada entre pasos cromatográficos para intercambiar buffers (diafiltración) y concentrar soluciones.

Etapa de acabado Las operaciones de acabado comprenden aquellas que se realizan para obtener el producto en su presentación final. Las principales operaciones utilizadas son: cristalización, secado, esterilización y estabilización del producto.

Cristalización La cristalización se utiliza para obtener el producto en forma sólida, mejorando su manejo y conservación.

Secado Se realiza mediante secadores por aspersión, lechos fluidizados y secadores en charolas. En el caso de productos termolábiles se utilizan los liofilizadores.

Esterilización Los microfiltros de membrana son utilizados para esterilizar soluciones biofarmacéuticas, removiendo cualquier contaminación bacteriana. Una limitante de estas membranas es la incapacidad para la remoción de pirógenos y virus. Para minimizar el riesgo de contaminación, el agua utilizada deberá estar libre de pirógenos.

Estabilización Para incrementar la vida del producto se utilizan como agentes estabilizadores algunas sales como sulfato de amonio, cloruro de calcio o cloruro de sodio. Algunos productos son más estables como sólidos.

2.4.2. Análisis y Evaluación del Bioproceso

Una vez establecido el diagrama de flujo del bioproceso es necesario realizar el análisis económico, ambiental y social del mismo. Este tipo de análisis puede apoyarse con el uso de paquetes computacionales apropiados.

Evaluación económica

El análisis del bioproceso desde el punto de vista económico comprende actividades como: a) el análisis del mercado y el establecimiento de las especificaciones del producto y b) la evaluación económica del bioproceso.

Mercado y especificación del producto El mercado es un factor muy importante para el establecimiento de un bioproceso, ya que determina el precio del producto (o la necesidad de su producción) y el volumen de la demanda. Es obvio que entre mayor sea el precio del producto, mayor es el ingreso esperado por ventas. La demanda y la participación esperada sirven de base para determinar el volumen de producción. Uno de los objetivos cuando se diseña un bioproceso es maximizar la productividad (kg/L-año) del producto en el fermentador y el porcentaje de rendimiento global en las operaciones de bioseparación, ya que esto minimiza el volumen de producción (VPrd), que se puede expresar como:

$$\text{VPrd} = \frac{\left[\text{Demanda}\ \left(\frac{\text{kg}}{\text{año}}\right)\right]\ [\text{Participación}\ (\%)]}{\left[\text{Productividad}\ \left(\frac{\text{kg}}{\text{L} - \text{año}}\right)\right]\ [\text{Rendimiento global}\ (\%)]} \tag{2.1}$$

El mercado de los productos biotecnológicos puede enmarcarse entre dos casos extremos (Tabla 2.2): a) productos de alto valor, bajo volumen de producción y libres de competencia, como el t-PA y b) productos de alto volumen de producción, en mercados muy competitivos, como la rBST. En los productos libres de competencia, es posible que se seleccione el primer proceso exitoso que se logre en el laboratorio. Sin embargo, si el mercado del producto aumenta y aparecen nuevos competidores, la economía del proceso cobra especial importancia (Spalding, 1991).

Tabla 2.2: Influencia de la demanda del mercado en el precio del producto. Datos de USA.

Compañía	**Producto**	**$/dosis**	**No. dosis**	**Masa**
GENENTECH	t-PA (Activasa)	$ 2,000.00	150,000	15 kg
Diversas	rBST*	$ 0.50	5×10^8	50 ton

Datos Spalding, 1991
* Somatotropina de Bovino

Actualmente varios productos biotecnológicos modernos están libres de competencia, pero existe una tendencia hacia un incremento en la competitividad

del mercado, particularmente en el uso de genéricos por patentes vencidas. Es en esta transición donde el diseño adecuado de los bioprocesos cobra especial relevancia.

El primer paso en la selección de un proceso es la definición del objetivo del mismo, especificando claramente la pureza y rendimiento que se desea obtener. Con frecuencia las especificaciones sobre pureza del producto son establecidas por regulaciones legales o por el mercado. Las especificaciones de rendimiento son fijadas para asegurar la economía del proceso. De manera ideal el rendimiento debe ser una variable dependiente del diseño de proceso, en la búsqueda de la optimización del mismo. En la práctica, debido a limitaciones de tiempo esta fase no siempre se concluye (Null, 1987).

Ejemplo 2.2. Variación del volumen de fermentación con la productividad y el rendimiento.

Graficar el efecto de la productividad (intervalo 0.01 − 0.20 kg/L−año) y rendimiento global (intervalo 10 − 100 %) sobre el volumen de fermentación, cuando la demanda de un producto es de 1000 kg/año y la participación de mercado del 50 %.

Solución:

El programa MATLAB para la solución del ejemplo se presenta en la Figura 2.3.

```
% Bioseparaciones 2da Edicion
% Ejemplo_2.2 Variación del volumen de fermentación
%             con la productividad y el rendimiento
% Nombre del archivo ejemplo_2.2
clear
clf
% Entrada de datos
% Demanda de producto kg/año
de=1000;
% Participacion de mercado (%)
pa=50;
% Intervalo de rendimiento (%)
re=[10:5:100];
% Intervalo de productividad (kg/L-año)
prd=[0.01:0.01:0.20];
% Cálculo de volumen de fermentación (L)
vp=(de*pa/100)./(prd'*re/100);
% Impresión de resultados
surf(re,prd,vp)
colorbar
xlabel('Rendimiento (%)','FontSize',10)
ylabel('Productividad (kg/L-año)','FontSize',10);
zlabel('Volumen (L)','FontSize',10)
```

Figura 2.3: Programa MATLAB para la solución del Ejemplo 2.2.

La Figura 2.4 muestra el efecto de la productividad y el rendimiento global sobre el volumen de fermentación bajo las condiciones estudiadas. Conforme la productividad y el rendimiento disminuyen, el volumen de fermentación aumenta en un amplio rango de 2,500 a 500,000 L.

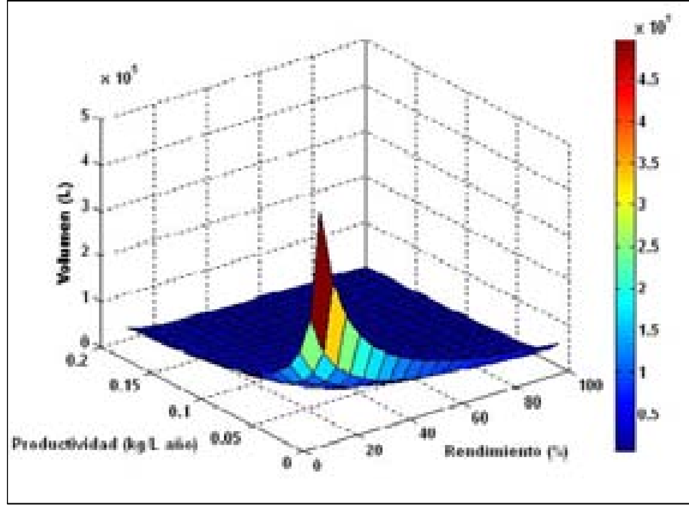


Figura 2.4: Solución Ejemplo 2.2. Variación del volumen de fermentación con la productividad y el rendimiento.

Economía del bioproceso La evaluación económica del bioproceso es una herramienta que involucra el análisis de los ingresos esperados, los costos de adquisición del equipo, la inversión total de capital, el costo anual de operación, el flujo de efectivo y la rentabilidad del proceso (Datar y Rosén, 1990).

Ingresos anuales Los ingresos anuales esperados (I) de un proyecto, se obtienen de multiplicar del precio unitario del producto (P) por las unidades de producto(s) vendidas anualmente (X) , es decir:

$$I = PX \tag{2.2}$$

Análisis de costos Una vez que ha sido definido el objetivo de la bioseparación, esto es, que se ha identificado el producto que se desea obtener y se ha establecido el bioproceso, se deben estimar los costos asociados al mismo. En la Figura 2.5 se presenta un enfoque para la estimación de costos basado en el costo de adquisición del equipo.

Costo de adquisición de equipo. Una vez definido el diagrama de flujo propuesto y el volumen de producto a producir, se dimensionan los equipos, se estima su costo y se calcula el costo de adquisición del equipo (PC). El costo de adquisición de un equipo representa el desembolso para adquirirlo y ponerlo en condiciones de ser utilizado en la actividad. Éste incluye la compra y demás erogaciones necesarias, como fletes, seguros, honorarios de aduana, trámites de registro en el caso de ser necesario, la construcción de plataformas, el montaje, la puesta en operación, los ensayos de puesta en marcha, el entrenamiento del

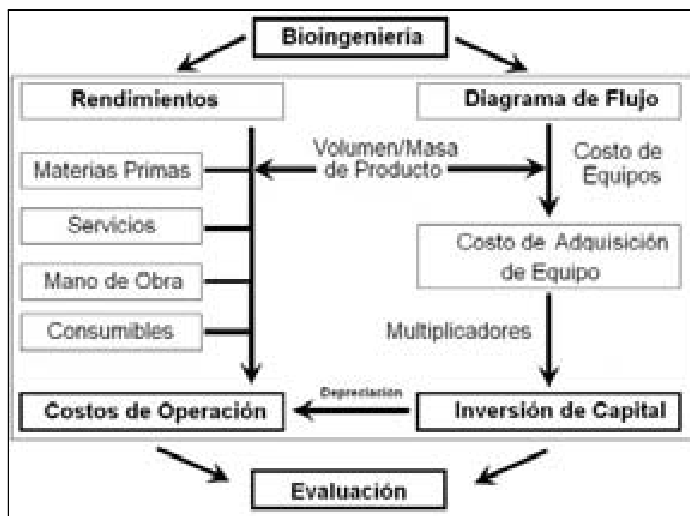


Figura 2.5: Pasos para la estimación del capital de inversión y los costos de operación de un bioproceso.

personal, entre otros. Puede incluirse también un estimado del costo de equipo periférico necesario, no incluido en el diagrama de flujo. Como el PC es la base de la estimación del capital, la precisión del cálculo dependerá en gran medida de este rubro. Las cotizaciones de los fabricantes y los datos de la literatura son las principales fuentes de información.

Inversión total de capital. A partir del costo total de adquisición del equipo, mediante el uso de multiplicadores se estima el monto de la inversión total de capital (TCI). En la Tabla 2.3 se presentan los rubros que integran la TCI y algunos valores típicos de los multiplicadores utilizados.

La inversión total de capital (TCI) se refiere a todos los fondos necesarios para el diseño, construcción y arranque de la planta. Cuando se comparan dos procesos de bioseparación alternativos, se escoge el que requiere mayor capital solamente si la rentabilidad generada es tan grande que justifica la diferencia de requerimientos de capital entre ambas alternativas.

En este enfoque se utilizan multiplicadores para el cálculo de los diversos conceptos de la inversión total de capital (TCI). Ésta se integra por la inversión fija directa (DFC), el capital de trabajo (WC) y el costo de arranque y validación (SVC), de tal manera que:

$$TCI = DFC + WC + SVC \tag{2.3}$$

La inversión fija directa está relacionada con los desembolsos para construir la planta. El capital de trabajo es la inversión adicional necesaria para desa-

Tabla 2.3: Rubros para la estimación de la inversión total de capital (TCI).

Rubro	Concepto	Monto
Costos directos totales de planta ($TPDC$)		
	Adquisición de equipo	$1.00 \times PC$
	Instalación de equipo	$0.50 \times PC$
	Tubería	$0.40 \times PC$
	Instrumentación	$0.35 \times PC$
	Aislamiento	$0.03 \times PC$
	Electricidad	$0.15 \times PC$
	Edificios	$0.45 \times PC$
	Acondicionamiento	$0.15 \times PC$
	Servicios	$0.50 \times PC$
Costos indirectos totales de planta ($TPIC$)		
	Ingeniería	$0.25 \times TPDC$
	Construcción	$0.33 \times TPDC$
Costo total de planta (TPC)		$TPDC + TPIC$
Otras inversiones (AC)		
	Consultorías	$0.05 \times TPC$
	Contingencias	$0.10 \times TPC$
Inversión fija directa (DFC)		$TPC + AC$
Capital de trabajo (WC)		
	Mano de obra	30 días
	Materias primas	30 días
	Servicios	30 días
	Tratamientos	30 días
Capital de arranque y validación (SVC)		$0.05 \times DFC$

rrollar la operación normal de la planta una vez construida y comprende los requerimientos de sueldos, servicios e inventarios. Los costos de arranque y validación están asociados a las erogaciones necesarias antes del la operación de la planta.

Ejemplo 2.3. Cálculo de la inversión total de capital

Una planta mediana de producción de MAbs se ha diseñado para operar con un fermentador de producción de un volumen de $20,000$ L (Farid, 2007). El costo total de la adquisición del equipo se ha estimado en \$21,400 (todo en miles). El capital de trabajo es de \$3,294 y el costo de arranque y validación de \$30,654 (por arriba del valor típico).

Se pide: Calcular el monto de la inversión total de capital.

Solución: En la tabla siguiente se presenta el cálculo de la inversión fija directa (DFC) utilizando los multiplicadores.

Rubro	**Cálculo**	**Monto**
Costos directos totales de planta ($TPDC$)		
Adquisición de equipo	$1.00 \times 21,400$	$21,400
Instalación de equipo	$0.50 \times 21,400$	10,700
Tubería	$0.40 \times 21,400$	8,560
Instrumentación	$0.35 \times 21,400$	7,490
Aislamiento	$0.03 \times 21,400$	642
Electricidad	$0.15 \times 21,400$	3,210
Edificios	$0.45 \times 21,400$	9,630
Acondicionamiento	$0.15 \times 21,400$	3,210
Servicios	$0.50 \times 21,400$	10,700
$TPDC$	$3.53 \times 21,400$	75,542
Costos indirectos totales de planta ($TPIC$)		
Ingeniería	$0.25 \times 75,542$	18,886
Construcción	$0.33 \times 75,542$	24,929
$TPIC$	$0.58 \times 75,542$	43,814
Costo total de planta (TPC)		
TPC	$TPDC + TPIC$	119,356
Otras inversiones (AC)		
Consultorías	$0.05 \times 119,356$	5,968
Contingencias	$0.10 \times 119,356$	11,936
AC	$0.15 \times 119,356$	17,904
Inversión fija directa (DFC)		
DFC	$TPC + AC$	$137,260

Utilizando la ecuación (2.3) se tiene:

$$TCI = \$137,260 + \$3,294 + \$30,654 = \$171\,,208$$

Costo anual de operación. El costo de operación o fabricación está integrado por todos los costos para operar la planta y recobrar la inversión de capital. Como se muestra en la Tabla 2.4, el costo anual de producción se divide comúnmente en dos partes: costos de fabricación y gastos generales. En los costos de fabricación se ubican los costos de operación directos, los costos fijos y la parte proporcional de los gastos generales de la planta.

Dentro de los costos de operación directos se puede resaltar los costos de las materias primas que son consumidas directamente en el proceso de producción del producto o que son usadas en la recuperación del mismo, debido a que éstas constituyen la mayor parte de estos costos. Los costos de las materias primas son más relevantes en sistemas de producción basados en procesos biológicos que en plantas químicas convencionales. En los primeros las materias primas pueden representar del 30 al 80 % del costo de producción, mientras que en los convencionales sólo representan del 10 al 50 % de ese costo (Kalk y Langlykke, 1986).

Tabla 2.4: Rubros del costo anual de operación.

I. Costos de Operación Directos Variables	
A. Materias primas y suministros	a. Materia prima primaria b. Materia prima secundaria c. Fletes d. Operación e. Mantenimiento f. Laboratorio g. Otros
B. Mano de obra y supervisión	a. Salarios y estímulos b. Horas extras
C. Servicios	a. Vapor b. Electricidad c. Agua d. Tratamiento de desechos
II. Costos Fijos	
A. Depreciación B. Impuestos C. Seguros D. Renta	
III. Proporción de Gastos de Generales de la Planta	
IV. Administración	
V. Mercadotecnia	
VI. Investigación y Desarrollo	
Para estimación de costos: Costo de Fabricación (CF) = I+II+III Gastos Generales (GG) = IV+V+VI Costo Total del Producto = CF+GG	

En los procesos de producción biotecnológicos, no solamente las materias primas principales (aquellas que se convierten directamente a producto) tienen un impacto significativo sobre la economía del proceso, sino que también las materias primas secundarias como cofactores, enzimas, inductores y materiales de recuperación, influyen considerablemente en los costos de producción. Los sueldos y salarios representan una fracción importante del total de los costos de fabricación, esto es, del 10 al 40 %. Los costos fijos comprenden la depreciación de maquinaria y equipo, impuestos y seguros principalmente. La parte proporcional de los gastos generales de la planta que se le asignan al producto, son aquellos que se requieren para la operación eficiente de la planta pero no son asignables directamente al producto y se estiman entre el 10 y 50 % de los sueldos y salarios (Kalk y Langlykke, 1986). En la Figura 2.6 se presenta una estructura de costos típica para un producto biotecnológico.

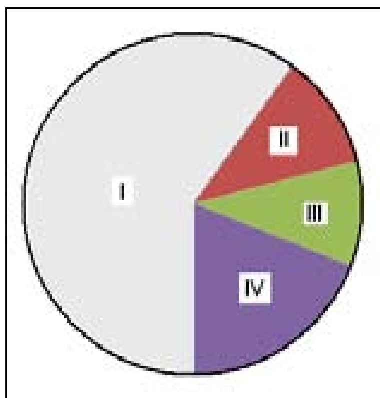


Figura 2.6: Estructura de costos típica de un producto biotecnológico. I) costos de operación directos (59 %), II) costos fijos (11 %), III) Proporción de gastos generales de planta (10 %) y IV) Gastos generales (19 %).

Flujo de efectivo Una vez que se han estimado los ingresos, la inversión total de capital y los costos de operación de un proyecto, es necesario estimar el flujo de efectivo del proyecto. El flujo de efectivo anual (para cada uno de los años del proyecto) se puede calcular de la siguiente manera:

Ingresos
− Costo operación
Utilidad bruta
− ISR
Utilidad neta
+ Depreciación
Flujo de efectivo

Análisis de rentabilidad Con los flujos de efectivo estimados es posible evaluar la rentabilidad del bioproceso. Existen varios índices que se utilizan en forma integral para medir la rentabilidad siendo los más utilizados el margen bruto, el retorno sobre la inversión y el periodo de pago en años.

Margen bruto. Se define como la utilidad bruta sobre las ventas netas. Expresa la utilidad bruta que se está generando por cada peso vendido y se puede expresar como:

$$\text{Margen bruto} = \frac{\text{Utilidad bruta}}{\text{Ingresos}} \times 100 \tag{2.4}$$

Retorno sobre la inversión (*ROI*). Se define como el flujo de efectivo sobre la inversión total de capital. Es una medida de los beneficios del proyecto y se expresa como:

$$ROI = \frac{\text{Flujo de efectivo}}{\text{Inversión total}} \times 100 \tag{2.5}$$

Periodo de retorno. Corresponde al periodo de tiempo necesario para que el flujo de efectivo cubra el monto total de la inversión. Es una medida del tiempo necesario para recuperar la inversión. Para caso particular que el flujo de efectivo anual sea igual a través de los años, se tiene:

$$\text{Periodo de retorno} = \frac{\text{Inversión total}}{\text{Flujo de efectivo}} \tag{2.6}$$

Ejemplo 2.4. Rentabilidad de un proceso para la producción de MAbs.

Se desea producir MAbs y se cuenta con los siguientes datos de mercado y de producción:

	Concepto	**Monto**
Mercado	Precio	$200,000/kg
	Dosis	1.0 g/dosis
	Demanda	1,555,260 dosis/año
Producción	Conc. fermentador	1.992 g/L
	Rendimiento	63.5 %
	Ciclo	84 h
	Año	330 días

La demanda anual es:

$$\text{Demanda} = 1.0\ \frac{\text{g}}{\text{dosis}} \times 1,555,260\ \frac{\text{dosis}}{\text{año}} \times \frac{\text{kg}}{10^3\ \text{g}} = 1,555.26\ \frac{\text{kg}}{\text{año}}$$

El volumen de fermentación total (V_t) se estima en:

$$V_t = \frac{1,555.26\ \frac{\text{kg}}{\text{año}}}{1.992\ \frac{\text{g}}{\text{L}} \times \frac{\text{kg}}{1000\ \text{g}} \times 0.635} = 1.23 \times 10^6\ \frac{\text{L}}{\text{año}}$$

Volumen de fermentación por ciclo (V_c):

$$V_c = \frac{1.23 \times 10^6\ \frac{\text{L}}{\text{año}}}{330\ \frac{\text{día}}{\text{año}} \times \frac{\text{ciclo}}{84\ \text{h}} \times \frac{24\ \text{h}}{\text{día}}} = 13,045\ \frac{\text{L}}{\text{ciclo}}$$

Este volumen de 13,045 L/ciclo puede ser manejado por un solo fermentador. Si se considera el volumen de fermentación como el 70 % del volumen total del fermentador, entonces el volumen del fermentador seleccionado V_f es:

$$V_f = 20,000\ \text{L}$$

Considerando este fermentador se realizan las siguientes estimaciones de costos (miles dólares).

Inversión total de capital.

$$TCI = \$171,208$$

Costo anual de operación (miles).

Costos de operación directos	
Materias primas y suministros	
materia prima primaria	$16,524
consumibles	22,756
laboratorio	9,772
Mano de obra y supervisión	19,544
Servicios	
luz, agua, electricidad	46
tratamiento de desechos	82
Costos Fijos	
depreciación	13,039
impuestos, seguros y renta	12,148
Total	**$93,911**

Se pide estimar para este proceso:
a) Ingreso anual
b) El flujo de efectivo anual ($ISR = 40\,\%$)
c) El margen bruto
d) El retorno sobre la inversión.
e) El periodo de pago
f) El costo promedio del producto.
Solución:

a) Ingreso anual (miles) por ecuación (2.2),

$$I = 1,555.26\ \frac{\text{kg}}{\text{año}} \times \frac{\$200,000}{\text{kg}} = \$311,052$$

b) Flujo de efectivo (miles).

Ingreso anual	$311,052
Menos costo anual	93,911
Utilidad bruta	217,141
Menos 40 % ISR	86,856
Utilidad neta	130,285
Más depreciación	13,039
Flujo de efectivo	$143,324

c) Margen bruto por ecuación (2.4),

$$\text{Margen bruto} = \frac{\$217,141}{\$311,052} \times 100 = 70\,\%$$

d) Retorno de la inversión por ecuación (2.5),

$$ROI = \frac{\$143,324}{\$171\,,208} \times 100 = 83.7\,\%$$

e) Periodo de retorno por ecuación (2.6),

$$\text{Periodo de retorno} = \frac{\$171,208}{\$143,324} = 1.2 \text{ años}$$

f) El costo promedio (miles) se obtiene mediante el cociente del costo anual y la producción estimada del producto, esto es:

$$\text{Costo promedio} = \frac{\dfrac{\$93,911}{\text{año}}}{1,555.2\ \dfrac{\text{kg}}{\text{año}}} = \frac{\$60.39}{\text{kg}}$$

Evaluación ambiental

Durante el desarrollo del bioproceso se debe realizar la evaluación ambiental que comprende identificar, analizar y manejar tan pronto como sea posible, los daños potenciales a la salud, la seguridad y el ambiente que se derivan del mismo, para evitar consecuencias negativas (riesgos, costos y mayores tiempos de desarrollo). La evaluación de los efectos ambientales de un bioproceso puede contribuir significativamente a evitar agravar los problemas ambientales como el cambio global y el agotamiento de los combustibles fósiles. Existen varios reportes en la literatura para realizar este tipo de evaluaciones basados en diferentes suposiciones, límites y metodologías, por lo que sus resultados son difíciles de comparar (Hermann *et al.*, 2007).

Recientemente, ha sido propuesto un método con una estructura sencilla que permite realizar una evaluación ambiental en las primeras etapas de un bioproceso en desarrollo (Biwer y Heinzle, 2004). El método puede manejar la incertidumbre en las fases tempranas del desarrollo del bioproceso, incluyendo los impactos ambientales relevantes y es simple y fácil de aplicar. En el método se establecen 14 categorías de impacto, donde cada compuesto es clasificado de acuerdo a la metodología ABC, en función de su relevancia alta, media o baja dentro de una de las categorías. Por ejemplo, en la categoría de Grado de toxicidad, una sustancia muy tóxica se asigna como clase A, una sustancia menos tóxica a la clase B y una sustancia no tóxica a la clase C (Zhang *et al.*, 2008).

Las categorías de impacto se agrupan a su vez en seis grupos: Recursos, Entradas grises, Riesgo del componente, Organismos, Aire y Agua/Suelo. A

partir de éstas se deducen los factores ambientales de los componentes de entrada y de los componentes de salida, que representan la relevancia ambiental de cada sustancia. Estos factores se combinan con los balances de masa para generar un conjunto de índices que pueden ser utilizados para optimizar el comportamiento ambiental del bioproceso de una manera integral. Particularmente, el índice de masa (MI) permite establecer la masa consumida de un componente por unidad de producto final y el índice ambiental (EI) se utiliza para evaluar la relevancia ambiental de determinado compuesto. La suma de los índices individuales se conoce como índice general y permite comparar procesos alternativos.

Evaluación social

Los bioprocesos pueden contribuir al desarrollo sustentable, pero esto no ocurre automáticamente. Para evaluar la sustentabilidad social de los bioprocesos, recientemente se han desarrollado varios conceptos y una metodología novedosa (Geibler *et al.*, 2005). Mediante un enfoque multiperspectivo se han identificado ocho aspectos que son significativos para realizar esta evaluación (Tabla 2.5).

Tabla 2.5: Indicadores para describir y evaluar la sustentabilidad social.

	Indicadores	
Aspecto	**Desarrollo tecnológico**	**Aplicación de la tecnología**
Salud y seguridad	- Grupos de riesgo - Factores de riesgo - Pruebas en voluntarios	- Riesgo esperado - Sustancias tóxicas - Mediciones de salud
Calidad de las condiciones de trabajo	- Tiempo de trabajo - Participación de mujeres - Condiciones de trabajo	- Tiempo de trabajo esperado - Participación esperada - Medidas para mejorar éstas
Empleo	- Estabilidad - Regiones de creación - Continuidad	- Estabilidad esperada - Regiones posibles - Efecto en el mercado laboral
Educación y entrenamiento	- Áreas de entrenamiento - Manejo de recursos	- Planeación - Necesidades
Manejo del conocimiento	- Calidad del intercambio - Sistemas de información	- Planeación - Planeación
Potencial de innovación	- Potencial comercial - Contribución científica - Patentes	- Grado proyectado - Penetración de mercado - Número y tipos
Aceptación y beneficio social del producto	- Participación de clientes - Uso de Ing. Genética - Beneficio social	- Aceptación del producto - Planeación - Contribución
Diálogo social	- Reportes voluntarios - Comunidad local - Participación política	- Canales de información - Comunicación planeada - Promoción del diálogo

Los aspectos que se consideran son: salud y seguridad, calidad de las condiciones de trabajo, empleo, educación y entrenamiento, manejo del conocimiento, potencial de innovación, aceptación y beneficio social del producto, y diálogo social. Para cada aspecto se han identificado 8 indicadores (en la Tabla 2.5 sólo aparecen algunos de éstos) que cubren dos niveles de evaluación: a. desarrollo tecnológico y b. aplicación de la tecnología. Esta distinción se ha hecho debido a que las condiciones en que se desarrolla un bioproceso pueden ser muy diferentes a las condiciones de su aplicación. A cada indicador se le asigna una puntuación máxima de 3 puntos, de tal manera que cada nivel de evaluación puede alcanzar una puntuación máxima de 96 puntos (8 aspectos $\times$ 4 indicadores $\times$ 3 puntos). Este método sencillo permite evaluar la sustentabilidad social de un bioproceso y puede ser adaptado a diferentes contextos.

2.5. Sumario

El diseño de un bioproceso comprende diversas actividades basadas en la experiencia, la teoría y el apoyo computacional disponible. Estas actividades comprenden la síntesis, el análisis, la evaluación y la optimización del bioproceso. La síntesis del bioproceso consiste en establecer el diagrama de flujo del bioproceso, que en la práctica se realiza mediante el método heurístico. Actualmente, existen diversos paquetes computacionales para realizar el análisis y la evaluación del bioproceso a partir del diagrama de flujo establecido.

2.6. Problemas

2.1. Rendimiento global. El proceso de obtención de una enzima consta de cuatro operaciones de separación, cada una de ellas presenta un rendimiento del 80 %. Estimar el rendimiento global del proceso.

2.2. Precio y ROI. Se cuenta con los siguientes datos para producir insulina recombinante:

(A) Mercado	
Producción	1,000 kg/año
(B) Costos anuales	Miles
Año 1	$34,877.00
Años 2-10	$31,525.00
(C) Depreciación	$2,766.00
(D) Inversión fija directa y de arranque	$30,468.00
(E) Capital de trabajo	$2,742.00
(F) ISR	45 %

Se pide estimar:
a) El precio de venta para obtener un retorno sobre la inversión (ROI) del 40 %.
b) El periodo de retorno.
Resp. a) $54,000/kg

2.3.Comparación de esquemas de bioprocesos. Una proteína puede ser purificada por afinidad, mediante los siguientes 2 enfoques:
a) La proteína se produce fusionada a una señal peptídica y a una cola que permiten que la proteína sea excretada al medio de cultivo y pueda ser eficientemente purificada por afinidad. Después de la purificación la proteína requiere de un paso enzimático para eliminar la cola.
b) La proteína se produce en forma convencional y se purifica mediante afinidad con anticuerpos monoclonales como ligandos.
Se pide: Desarrollar y comparar los diagramas de flujo de los dos enfoques.

2.4. Esquemas de producción en animales y plantas. Actualmente existe un gran interés en la producción de proteínas y vacunas tanto en animales como en plantas, dado que ofrecen ventajas como mayor facilidad de la purificación respecto a sistemas bacterianos.
Se pide: Desarrollar y comparar los diagramas de flujo para la producción de una proteína a partir de leche de cabra y de plantas de tabaco transgénicas. Determine la información necesaria para realizar la evaluación del mismo.

2.5. Efecto de la concentración de los caldos sobre la escala de producción. Una planta industrial con un volumen de producción $VPrd$ (L),

produce un número de lotes por año n, con una concentración de producto C (g/L). La recuperación global es RG.

Se pide:

a) Escribir la expresión de la producción anual de la planta PA (kg/año) en función de n, $VPrd$, C y RG.

b) Escribir una expresión para calcular el volumen de producción (escala) $VPrd$ (L) para cumplir con una demanda de D (kg/año) .

c) Graficar el efecto de la demanda sobre la escala de producción para $n = 20$ lotes/año, $RG = 50\,\%$ y valores de C de $0.5, 1.0, 1.5, 2.0$ y 2.5 g/L.

Resp. inciso c)

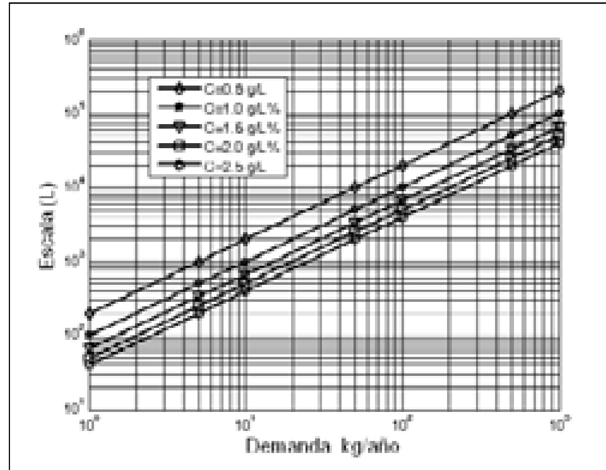


Figura 2.7: Solución del problema 2.5 inciso c. $n = 20$ lotes/año y $RG = 50\,\%$.

2.6. Esquema de bioseparación de un virus. Un nuevo virus del SARS (150 nm de diámetro) se produce en un cultivo de células Vero inmovilizadas en microacarreadores, para la producción de una vacuna. Inicialmente se propagan las células a una alta concentración y posteriormente se infectan con el virus para su reproducción. Las células infectadas eventualmente se rompen y secretan los nuevos virus al medio, produciéndose además una cantidad apreciable de desechos celulares. Para la recuperación de los microacarreadores (partículas de 200 μm) se utiliza una malla de 50 μm. A partir del filtrado se recuperan los virus separándolos de los restos celulares y demás contaminantes.

El bioproceso de producción cuenta con el siguiente equipo que puede ser utilizado en más de un paso:

a) Una unidad de microfiltración con poros de 0.1 μm.

b) Una columna cromatográfica de SEC que retiene proteínas de peso molecular menor a 300 kDa.

c) Una unidad de ultrafiltración de 200 kDa de tamaño de corte (poro de 10 nm).

d) Una columna cromatográfica de intercambio catiónico.

Se pide: Diseñar el esquema de bioseparación del virus y explicar su fundamentación. Los equipos pueden ser reutilizados varias veces.

2.7. Esquema de bioseparación de una proteína extracelular. En un bioproceso con células de mamífero se obtiene como producto extracelular la proteína MX de 100 kDa de peso molecular y punto isoeléctrico de 6.5. A la salida del fermentador de producción se obtienen 1000 L de caldo con un pH = 7.1 y con la composición siguiente:

Componente	**Cantidad por litro**
Células	1.0 g
Proteína MX	1,000 unidades
Proteína total	2.0 g
Orgánicos de bajo PM	3.0 g
Sales inorgánicas	10.0 g

En el bioproceso se utilizan las siguientes bioseparaciones unitarias:

a) Una ultrafiltración de 40 kDa de tamaño de corte.

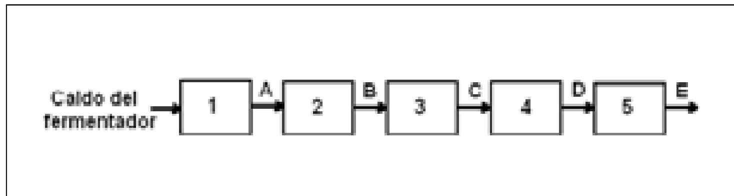
b) Una diafiltración de 4 kDa de tamaño de corte.

c) Una microfiltración de 1.0 μm de tamaño de poro.

d) Una columna cromatográfica de intercambio catiónico de elución por gradiente.

e) Una columna de afinidad con un anticuerpo para proteína MX como ligando, cuya máxima capacidad se obtiene a un pKa = 8.5.

El bioproceso se puede representar de la siguiente forma:



Representación del bioproceso del Ejemplo 2.7.

La composición de las 5 corrientes a la salida de las bioseparaciones es la siguiente:

Componente	**Corrientes (no ordenadas)**				
Células (g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteína MX (unidades/L)	500	9,800	8×10^5	9×10^6	1×10^6
Proteína total (g/L)	1.0	18.5	500.0	560.0	625.0
Orgánicos de bajo PM (g/L)	1.5	1.2	0.0	0.0	0.0
Sales inorgánicas (g/L)	8.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Volumen colectado (L)	1800.0	90.0	1.0	1.3	0.8
pH	7.0	7.0	4.0	6.0	6.0

Se pide:

a) Establecer la secuencia de las bioseparaciones(1-5) y especificar la composición de corrientes (A-D) del bioproceso y razonar su respuesta.

b) Si la solución final de proteína MX debe estar a un pH =7.4, ¿se requieren bioseparaciones adicionales?.

2.8. Secuencia de bioseparación de un antígeno. Un antígeno de superficie de peso molecular de 100 kDa de un virus es producido en un cultivo de células de ratón recombinantes. Al final de la fermentación el caldo de cultivo contiene 10^7células/cm^3 y 500 μg/cm^3 de la proteína de interés. El caldo contiene además, aproximadamente 900 μg/cm^3 de proteínas contaminantes (no consumidas como nutrientes o liberadas en la lisis de algunas células) y varios compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos, vitaminas y sales. La mayoría de las proteínas contaminantes tienen un peso molecular mayor a 50 kDa. El producto requiere un alto grado de pureza dado que es para uso humano en forma inyectable.

En el bioproceso se utilizan las siguientes bioseparaciones unitarias:

a) Una microfiltración (diámetro de poro 0.2 μm)

b) Una columna de intercambio catiónico que se opera con un gradiente de elución de pH con buffer de acetatos.

c) Una columna cromatográfica de SEC de rango entre 50 y 150 kDa.

d) Una ultrafiltración de tamaño de corte de 10 kDa.

e) Una columna de intercambio aniónico que se eluye con un gradiente salino de NaCl.

f) Una unidad de diafiltración para intercambio de buffers.

g) Una columna de sílica gel para adsorción de DNA que es altamente selectiva

h) Uno de los equipos se utiliza más de una vez.

Los datos de control de calidad del bioproceso sobre la actividad específica y la concentración del producto, así como la concentración de DNA contaminante, se presentan en la siguiente tabla:

	Producto		**DNA**	
Paso	μg/cm^3	μg/μg *total*	pg/mg	Operación
1	500	0.36	ND	
2	5,000	0.35	ND	
3	9,000	0.50	ND	
4	9,000	0.50	ND	
5	8,000	0.95	2	
6	1,000	>0.99	0.1<	
7	800	>0.99	0.1<	
8	3,000	>0.99	0.1<	

Se pide: Establecer la secuencia de las bioseparaciones que se emplean y razonar su respuesta.

2.9. Esquema de bioseparación de una polimerasa resistente a temperatura. Se va a producir DNA polimerasa que es estable a 90 °C y ha sido clonada en *E. coli* de *Archeabacterium*. La *E. coli* no es termofílica de tal manera que prácticamente todas sus proteínas nativas son destruidas si se someten a un tratamiento a 60 °C por 30 min. La polimerasa será utilizada en un procedimiento de PCR para elaborar un producto de DNA que se va utilizar en un chip de genes. Por lo tanto, la polimerasa no requiere estar muy pura, pero si libre de DNA y RNA y enzimas relacionadas con DNA.

Se pide: Proponer un esquema de bioseparación de la DNA polimerasa.

2.10. Preparación de soluciones. Una planta prepara lotes de 1000 L de solución 2.0M de NaCl. Esta solución es utilizada para regenerar una columna de intercambio aniónico de 70 L de volumen de operación, para lo cual se requieren 3 CV de solución 2.0M de NaCl por cada corrida.

Se pide: Estimar el número de corridas que pueden realizarse por cada lote de solución preparada.

2.7. Bibliografía

Asenjo, J.A.; Andrews, B.A. **2008.** Challenges and trends in bioseparations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 117–120.

Biwer, A.; Heinzle, E. **2004**. Environmental assessment in early process development. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 597-609.

Datar, R.; Rosén, C. **1990**. Downstream process economics. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York. 741-793.

Farid, S.S. **2007**. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. *J. Chromatogr. B.* 848 , 8–18.

Geibler, J.; Wisniewski, J.; Türk, V.; Wallbaum, H. **2005**. Governing new technologies towards sustainability: international organisations and social indicators. Berlin Conference on the Human Dimensions of Global Environmental Change. Berlin, Germany.

Hermann, B.G.; Blok, K.; Patel, M.K. **2007**. Producing bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7915-7921.

Kalk, J. P.; Langlykee, A. F. **1986**. Cost estimation for biotechnology projects. En: *Industrial Microbiology and Biotechnology.* Demain, A. L.; Solomon, N. (Eds.). American Society for Microbiology. New York. 363-384.

Nfor, B.K.; Ahamed, T.; van Dedem, G.W.; van der Wielen, L.A.; van de Sandt, E.J.; Eppink, M.H.; Ottens, M. **2008**. Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83,124–132.

Null, H.R. **1987**. Selection of a separation process. En: *Handbook of Separation Process Technology.* Rousseau, R. W. (Ed.). John Wiley & Sons. New York. 22, 982-995.

Petrides, D.P.; Cooney, C.R.; Evans, L.B. **1989**. An introduction to biochemical process design. En: *Chemical Enginnering Problems in Biotechnology.* Shuler, M. L. (Ed.). AIChE. New York. 351-391.

Prokopakis, G.J.; Asenjo, J A. **1990**. Synthesis of downstream processes. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York. 571-601.

Spalding, B. **1991**. Downstream processing: Key to slashing production cost 100 fold. *Bio/Technology.* 9, 229-240.

Zhang, X.; Li, C.; Fu, C.; Zhang, S. **2008**. Environmental impact assessment of chemical process using the green degree method. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 1085-1094.

Parte II

Recuperación del Producto

En esta Parte II del libro se revisan las operaciones de remoción de insolubles y de ruptura celular que son utilizadas en las primeras etapas de los esquemas de bioseparación de acuerdo a las tres primeras reglas heurísticas de la selección de un bioproceso. Estas operaciones presentan retos importantes debido a que deben ser ejecutadas de manera expedita para minimizar pérdidas y cumplir con las normas requeridas (Roush y Lu, 2008).

En la remoción de insolubles de un caldo pueden ser utilizados diversos tipos de equipos. La selección depende de varios factores particularmente del tipo de material a tratar, así como de la disponibilidad, eficiencia y costo de los equipos. Los principales componentes insolubles que se consideran en esta parte son células enteras, restos celulares, precipitados y cuerpos de inclusión. Las operaciones típicas de remoción de insolubles son: a) la filtración que es muy utilizada para la separación de hongos filamentosos y en la clarificación de caldos y b) la centrifugación que es empleada en la separación de levaduras, bacterias y células de mamíferos. Estas operaciones se tratan en los Capítulos 3 y 4, respectivamente.

Cuando el producto de interés es intracelular después que las células han sido separadas del caldo es necesario romperlas. En el Capítulo 5 se presentan los fundamentos de la ruptura celular, los principales equipos que se emplean en esta operación a nivel industrial y las metodologías para su diseño.

Capítulo 3

Filtración

3.1. Introducción

La filtración consiste en la separación de un sólido de un fluido por acción de un medio filtrante y un gradiente de presión. La filtración puede ser utilizada para recuperar un sólido como en una cosecha celular o remover un sólido como en los procesos de eliminación de virus. En los procesos biotecnológicos se utilizan tres tipos de mecanismos de filtración (Fig. 3.1): a) filtración con formación de torta o filtración convencional, b) filtración de lecho profundo y c) filtración con membranas.

En la filtración con formación de torta los sólidos se depositan sobre el medio filtrante formando una pasta, mientras que en la filtración de lecho profundo los sólidos se depositan dentro del medio filtrante. La filtración por membrana se realiza utilizando membranas especiales de tamaño de poro muy pequeño, que generalmente operan con flujo paralelo a la membrana (cruzado), de tal manera que no hay un depósito de sólidos sobre la membrana sino una concentración del caldo.

El objetivo de este capítulo es presentar los aspectos fundamentales de la filtración convencional y la filtración de lecho profundo, así como su aplicación en la filtración de caldos biológicos. La filtración por membranas se revisa en el capítulo 10.

La sección 3.2 de este capítulo centra la atención en los fundamentos de la filtración. Los principales equipos de filtración que se utilizan a nivel proceso se presentan en la sección 3.3. La sección 3.4 se dedica a presentar los aspectos más relevantes del diseño de filtros convencionales y de lecho profundo.

3.2. Fundamentos

La filtración forma parte de un conjunto de operaciones llamadas Bioseparaciones Sólido-Líquido (BSL). Para llevar a cabo un proceso de BSL generalmente es necesario seleccionar entre una operación de filtración y una operación de sedi-

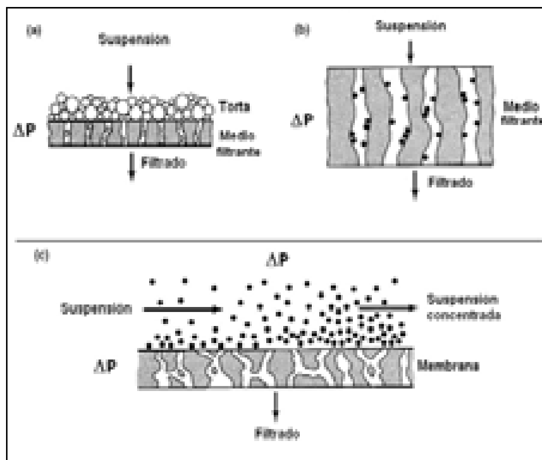


Figura 3.1: Mecanismos de filtración. a) Filtración con formación de torta, b) Filtración de lecho profundo y c) Filtración con membrana.

mentación (como la centrifugación). Frecuentemente la decisión es instrumentar una combinación de estos dos tipos de operaciones.

Debido a la naturaleza de los caldos que se manejan en bioseparaciones, es común que éstos sean pretratados mediante agentes físicos o químicos para mejorar su comportamiento en las operaciones de separación sólido-líquido a que van a ser sometidos.

Un aspecto fundamental en el tratamiento de la operación de filtración es la teoría básica existente, la cual contribuye al diseño, selección y operación racional de los diferentes equipos de filtración. De particular interés es observar como esta teoría puede ser utilizada en la filtración de caldos biológicos.

Con base a lo anterior, esta sección se centra en cuatro aspectos fundamentales:

- La filtración como parte de los sistemas de BSL.
- El pretratamiento de caldos biológicos.
- La teoría de la filtración convencional.
- La teoría de filtración de lecho profundo.

3.2.1. La Filtración como Parte de los Sistemas de BSL

Un proceso de separación sólido-líquido (Fig. 3.2) consta generalmente de una o más etapas (Tiller, 1974), entre las que destacan las siguientes: a) pretratamiento, b) concentración, c) separación de sólidos y d) postratamiento.

El pretratamiento mejora las propiedades del caldo para facilitar la biosepararación. La concentración de sólidos permite una separación gruesa de sólidos y

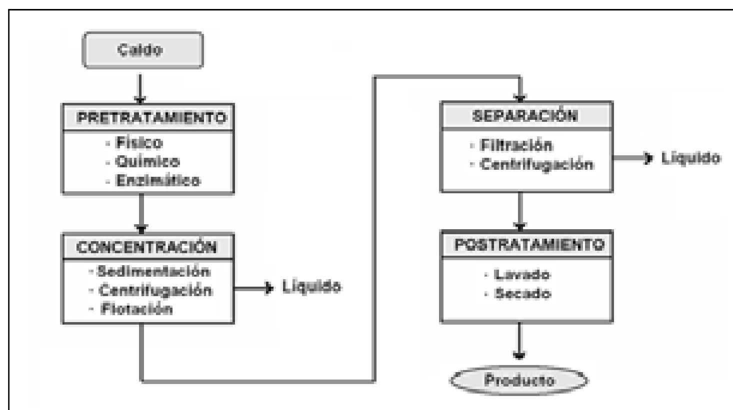


Figura 3.2: Etapas y métodos de las BSL. Adaptada de Tiller, 1974.

disminuir el volumen a manejar, lo que puede reducir los costos del proceso global de separación sólido-líquido. La mayor parte de los sólidos es obtenida en la etapa de separación. Los sólidos recuperados pueden requerir un postratamiento de lavado o secado de acuerdo con los requerimientos del proceso.

En el diseño y selección del bioproceso de BSL es necesario considerar varios factores de orden técnico que deben conjuntarse para una adecuada decisión. En la Tabla 3.1 se presentan algunos de estos factores agrupados de acuerdo a los requerimientos del proceso, las propiedades del caldo y los equipos disponibles.

Tabla 3.1: Factores para el diseño y selección de procesos de BSL.

Requerimientos del Proceso	Propiedades del Caldo	Características del Equipo
Flujo	Tamaño de partícula	Capacidad
Intermitente o continuo	Densidad	Intermitente o continuo
% Separación	Viscosidad	Tamaño de partícula
Postratamientos	Tiempo sedimentación	Concentración máxima
Esterilidad	% Sólidos	Capacidad de lavado
	Tipo de torta	Esterilidad
	Espumeo	Claridad de la descarga
	Toxicidad	
	Labilidad	

En general, todos los sistemas mecánicos de BSL están basados en dos principios que dan origen a las operaciones de sedimentación y filtración (Svarovsky, 2000). En el proceso de sedimentación la separación se basa en una diferencia de densidad entre la fase sólida y la fase líquida. Entre mayor sea esta diferencia la separación es más fácil. Cuando ésto no ocurre, la diferencia puede ser aumenta-

da aparentemente aplicando una fuerza centrífuga o incrementando la densidad de la partícula por medio de una coagulación o una floculación. Los principales equipos utilizados en BSL que se basan en el principio de sedimentación, son los sedimentadores por gravedad y las centrífugas.

En la filtración, la separación se logra utilizando un medio físico que no permite el paso de sólidos a través del cual el fluido se hace pasar por medio de un gradiente de presión.

En general los sistemas de sedimentación son más baratos y pueden operar continuamente, pero no recuperan el 100 % de los sólidos. Sin embargo, aún cuando el sedimentador no alcance la separación deseada, es posible utilizarlo conjuntamente con un filtro como una operación de concentración previa a la de acabado que se realiza con la filtración.

En el diseño y selección de sistemas para BSL es necesario también considerar algunos factores de orden práctico que permiten complementar los análisis que se efectúan en los capítulos correspondientes a esta parte del libro, dentro de los cuales se pueden destacar los siguientes:

1. Varias combinaciones de equipos pueden ser técnicamente factibles para lograr una determinada separación. Sin embargo, tratándose de materiales biológicos el número de posibilidades se reduce considerablemente.

2. El análisis teórico que se dispone de las BSL es limitado, así como el conocimiento de las propiedades básicas de los medios (tiempo de sedimentación, porosidad, permeabilidad, etc.), de tal manera que en el diseño y selección del equipo las pruebas experimentales directamente con el material, así como la experiencia, juegan un papel muy importante.

3. Parte considerable de la información, la experiencia y los equipos para pruebas experimentales, está en manos de las compañías fabricantes y/o distribuidoras del equipo.

4. La escala de experimentación varía con el tipo de operación. En el diseño de filtros puede ser suficiente los datos obtenidos en el laboratorio. En el caso de centrífugas es generalmente necesario realizar pruebas a nivel piloto o a escala industrial.

3.2.2. Pretratamiento de Caldos para BSL

Las propiedades de los caldos sujetos a BSL pueden ser mejoradas por medio de pretratamientos físicos, químicos o biológicos con el objeto de facilitar estas operaciones. A continuación se describen tres tipos de pretratamientos comúnmente empleados en caldos biológicos.

Pretratamiento térmico

El calentamiento de los caldos permite reducir su viscosidad, su volumen y romper estructuras gelatinosas que dificultan las operaciones posteriores. En el

caso de caldos de células recombinantes esta operación es obligada por cuestiones de seguridad ambiental. Por otro lado, esta operación es de uso limitado cuando se manejan productos termolábiles.

Coagulación y floculación

Debido a que los caldos biológicos sujetos a BSL presentan partículas muy pequeñas (0.5 a 100 μm), los pretratamientos para incrementar el tamaño de partícula facilitan su manejo.

Las partículas coloidales (tamaño en el rango de una micra) no sedimentan fácilmente debido a que por acción de sus cargas superficiales forman suspensiones muy estables llamadas soles, a diferencia de las suspensiones formadas por partículas de mayor tamaño que sedimentan con relativa facilidad.

Las soles pueden ser alteradas por medio de agentes químicos. En el proceso de coagulación se emplean electrolitos simples que neutralizan las cargas repulsivas superficiales de las células o partículas, lo cual genera fuerzas de atracción del tipo de London Van Der Waals entre ellas, que permiten formar partículas más grandes y densas. Los electrolitos más empleados son derivados de iones polivalentes positivos como fierro, aluminio y calcio. La coagulación también puede ser efectuada empleando sustancias que varíen el pH del caldo y por lo tanto la carga superficial de las partículas.

En el proceso de floculación se utilizan sustancias químicas sintéticas de alto peso molecular llamadas polielectrolitos. Existen dos mecanismos básicos de floculación: a) floculación por formación de puentes y b) floculación por neutralización (Roush y Lu, 2008). En el primero (Fig. 3.3a), los polielectrolitos producen un efecto combinado ya que actúan neutralizando las cargas superficiales de las partículas y provocan su atrapamiento por medio de las redes, aglomerándolas y formando una partícula más grande. En el segundo (Fig. 3.3b), los polielectrolitos neutralizan las cargas de las partícula pequeñas dejando expuestas las regiones hidrofóbicas, lo que provoca la precipitación isoeléctrica de los aglomerados.

Los polielectrolitos pueden ser aniónicos, catiónicos o neutros. La mayoría de los utilizados están cargados positivamente. Los materiales disponibles comercialmente son derivados de la poliacrilamida, polietilenimina, polisacáridos catiónicos, quitosán y la poliamina. Es importante señalar que los pretratamientos químicos son de uso limitado dado que implican la adición de sustancias al caldo que pueden agregar toxicidad o impurezas a éste.

Uso de ayudas-filtro

En las operaciones de filtración convencional y de lecho profundo se emplean sustancias sólidas llamadas Ayudas-Filtro (AF). Estas sustancias se adicionan al caldo antes de la filtración y/o se utilizan como precubierta del filtro. Las AF actúan como adsorbentes de las partículas coloidales mejorando el tamaño de partícula, la incompresibilidad y permeabilidad de los sólidos, de tal manera que se facilite su filtración.

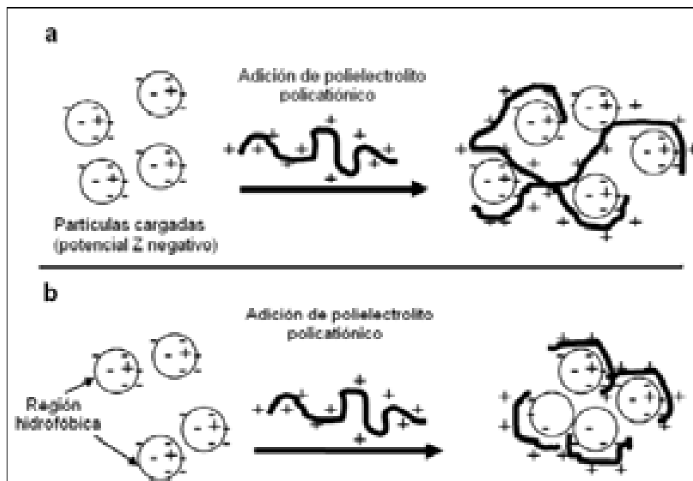


Figura 3.3: Mecanismo de floculación. a) Floculación por formación de redes y b) Floculación por neutralización. Sólo se muestra el caso cuando las partículas están cargadas negativamente y se tratan con un policatión.

Las AF más utilizadas son las tierras diatomeas y las perlitas (Rees, 1990). Las tierras diatomeas son restos de esqueletos de pequeñas plantas acuáticas prehistóricas que se obtienen de depósitos naturales. Las perlitas se obtienen de vidrios volcánicos que contienen de 2 a 5 % de agua, que permite romperlos por acción térmica o de presión, formando un polvo con características apropiadas como AF.

Con el uso de las AF la filtración se convierte en una operación de tres pasos:

1. Primero se forma una precubierta de AF sobre el medio filtrante haciendo reciclar sobre éste una lechada de AF.
2. Una vez formada la precubierta se inicia la alimentación del caldo a filtrar, al cual se le agrega continuamente una dosis de AF. Esto permite que las características de la superficie de filtración se mantengan uniformes.
3. Al final del ciclo la precubierta de AF debe ser removida.

La precubierta de AF permite retardar el taponamiento del filtro, facilita su limpieza, disminuye la caída de presión y produce un filtrado de calidad uniforme. La adición continua de AF al caldo es uno de los métodos más efectivos para minimizar los costos de filtración. La dosis de AF que es necesario agregar continuamente es función directa de la concentración y compresibilidad de los sólidos del caldo. Asimismo, entre más rápido se desee efectuar la filtración, la dosis necesaria es mayor, ya que para aumentar la velocidad de filtración se requiere un mayor gradiente de presión, lo que hace necesario aumentar la incompresibilidad y porosidad del material sólido.

Existen diversas marcas comerciales de AF que difieren básicamente en el tamaño de partícula. Las de partículas más grandes facilitan la filtración pero producen filtrados más turbios. La selección implica un compromiso entre el flujo deseado y la claridad aceptable.

3.2.3. Teoría de la Filtración Convencional

La filtración convencional (Fig. 3.1a) puede ser definida como la separación de los sólidos de un líquido con la formación de una torta. Ésta se efectúa haciendo pasar una suspensión a través de un medio permeable que retiene los sólidos utilizando un gradiente de presión.

La teoría de la filtración convencional se deriva de los estudios de la mecánica de fluidos en medios porosos. La ecuación que describe el movimiento de fluidos newtonianos a través de medios porosos, fue formulada en 1856 por el geólogo francés D'Arcy (Olivier *et al.*, 2007). La aplicación de esta ecuación al caso particular donde se desprecian los efectos gravitacionales (lechos cortos), puede ser escrita como:

$$v = \frac{k\Delta P}{\mu \ell} \tag{3.1}$$

donde [1]:

v: Velocidad superficial de líquido (flujo volumétrico por área de filtración). $[L/t]$.

k: Permeabilidad del lecho.$[L^2]$.

ΔP: Caída de presión a través del lecho. $[F/L^2]$.

ℓ: Profundidad del lecho filtrante. $[L]$.

μ: Viscosidad del fluido. $[M/L-t]$.

La velocidad de filtración puede ser descrita en términos del volumen de filtrado y el área de filtración (dos parámetros más fácilmente medibles) como:

[1] Las unidades de los miembros de las ecuaciones se presentan en términos de dimensiones fundamentales y entre paréntesis cuadrados. Las dimensiones fundamentales se representan como:

F: Fuerza.

M: Masa.

L: Longitud.

t: Tiempo.

^{o}: Temperatura.

Las unidades básicas empleadas en la mayor parte del texto corresponden a las del Sistema Internacional de medidas (SI).

$$\upsilon = \frac{1}{A}\frac{dV}{dt} \tag{3.2}$$

Combinando las ecuaciones (3.1) y (3.2) y expresando la relación ℓ/k como una resistencia R, se puede obtener la ecuación diferencial básica de la filtración convencional:

$$\frac{1}{A}\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu R} \tag{3.3}$$

En la ecuación (3.3) R es la resistencia total a la filtración. Esta resistencia puede expresarse como la suma de dos resistencias en serie:

$$R = R_t + R_m \tag{3.4}$$

donde R_t es la resistencia de la torta y R_m es la resistencia del medio filtrante.

Combinando la ecuaciones (3.3) y (3.4) se obtiene:

$$\frac{1}{A}\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu(R_t + R_m)} \tag{3.5}$$

Las ecuaciones (3.3) y (3.5) sólo pueden ser aplicadas a soluciones diluidas en régimen laminar, cuando el número de Reynolds modificado es menor a 5, o:

$$\frac{d_p \upsilon \rho}{\mu(1-\varepsilon)} < 5 \tag{3.6}$$

donde d_p es el diámetro de partícula o diámetro del poro en la torta, ρ es la densidad del fluido y ε es la fracción de espacio vacío del lecho. En general las biofiltraciones cumplen con esta condición.

3.2.4. Teoría de Filtración de Lecho Profundo

La filtración de lecho profundo es una separación sólido-líquido en la cual una suspensión, generalmente diluida, se hace pasar a través de un lecho empacado. Las partículas sólidas de la suspensión se unen a la matriz del lecho o a otras partículas previamente retenidas, de tal manera que son removidas del fluido (Fig. 3.1b). Los Filtros de Lecho Profundo (FLP) son muy usados para la remoción de bacterias, coloides y restos celulares. Son empleados en procesos de clarificación de caldos de anticuerpos monoclonales, remoción de DNA y preparación de soluciones para cromatografía. En algunos casos los FLP son usados para clarificar caldos de cultivo directamente. Frecuentemente también se utilizan conjuntamente con filtros de esterilización, para quitar carga a las membranas y disminuir costos (Rajniak *et al.*, 2008; van Reis y Zydne, 2007).

La filtración de lecho profundo ha sido ampliamente investigada mediante el uso de modelos matemáticos (Cushing y Lawler, 1998). La remoción de las

partículas suspendidas en un FLP pude ser descrita por la siguiente ecuación (Martin *et al.*, 1992):

$$\frac{dC}{dz} = -\left[\frac{a\,(1-\varepsilon)}{d_e}\right] C \tag{3.7}$$

o en forma integrada como:

$$\int_{C_e}^{C_s} \frac{dC}{C} = -\left[\frac{a\,(1-\varepsilon)}{d_e}\right] \int_{o}^{L} dz \tag{3.8}$$

$$\frac{C_s}{C_e} = \exp\left[-\frac{a\,(1-\varepsilon)\,L}{d_e}\right] \tag{3.9}$$

donde:

C_e : Concentración de partículas a la entrada del filtro
C_s : Concentración de partículas a la salida del filtro
a : Constante de eficiencia del filtro
ε : Porosidad
L : Profundidad del lecho
d_e : Diámetro equivalente del medio

Esta expresión permite calcular la fracción de partículas que permanece en suspensión a la salida del filtro. Este valor depende de las características geométricas del lecho, incluyendo el tamaño y porosidad, así como de la longitud del lecho. También depende de la naturaleza del flujo, las propiedades físicas de las partículas en suspensión, y de las fuerzas de interacción entre las partículas y el medio.

La ecuación (3.7) en su forma más sencilla fue formulada por T. Iwasaki (Cushing y Lawler, 1998) y puede expresarse como:

$$\frac{dC}{dz} = -\lambda C \tag{3.10}$$

donde λ es el coeficiente característico del filtro.

3.3. Equipo de Filtración

Existe una gran variedad de filtros cuyo mecanismo de filtración es la formación de una torta o la filtración de lecho profundo (Lutz *et al.*, 2009; Moir, 1982). Estos tipos de filtros se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Filtros convencionales por lotes a presión
    a) Marcos y placas
    b) Cámara con elementos filtrantes (hojas, charolas o tubos)
2. Filtros convencionales continuos al vacío

3. Filtros de lecho profundo
    a) Modulares, apilados o lenticulares
        1) Discos aplilados
        2) Cassettes
    b) Cápsulas

3.3.1. Filtros por Lotes a Presión

En los filtros por lotes a presión la solución que contiene el sólido a separar es alimentada continuamente al filtro. Una vez que se acumula una determinada cantidad de sólido sobre el medio filtrante, la operación es interrumpida para descargar la torta, limpiar el filtro e iniciar un nuevo ciclo. Este tipo de filtros pueden ser agrupados en dos categorías: a) filtros prensa de marcos y placas y b) filtros de cámara con elementos filtrantes (hojas, charolas o tubos).

En los filtros por lotes la torta debe ser descargada manualmente, por lo que este tipo de equipos puede tipificarse como de mano de obra intensiva, recomendables sólo para bajas escalas de producción.

Filtros de marcos y placas

Los filtros por lotes de más amplio uso son los filtros de marcos y placas (Fig. 3.4). La unidad de filtración está formada por un marco que contiene dos placas formando una cámara de filtración. Los filtros constan de varias de estas unidades que operan en paralelo produciendo un sólido bastante seco. Los filtros de marcos y placas normalmente operan en contacto con el ambiente y no son recomendables para cuando se trabaja con sustancias tóxicas.

Filtros de cámara con elementos filtrantes

Los filtros de cámara con elementos filtrantes (Fig. 3.5) toman su nombre del tipo y orientación de los elementos filtrantes. Operan en ambientes cerrados, tienen una relación de área/volumen relativamente alta y son utilizados cuando los volúmenes de filtración son bajos. Los filtros verticales son más baratos pero presentan una mayor dificultad para descargar la torta.

3.3.2. Filtros Continuos al Vacío

Los filtros continuos más utilizados en las bioseparaciones, principalmente en la producción de antibióticos, son los tipo tambor rotatorio al vacío (Fig. 3.6). Este tipo de filtros se distinguen de los intermitentes por el hecho de que al girar permiten una descarga continua de la torta, de tal manera que pueden operar continuamente por periodos largos de tiempo con flujos entre $200 - 1000$ L/m^2−h (Petrides *et al.,* 1989). Normalmente utilizan ayudas-filtro en dosis equivalentes a la concentración de sólidos del caldo, lo que origina un problema de desecho de sólidos.

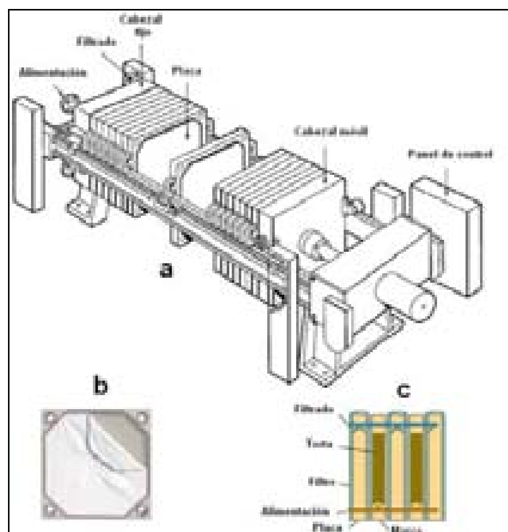


Figura 3.4: Filtros intermitentes de marcos y placas. a) Filtro, b) Elementos de filtración y c) Esquema del mecanismo de filtración. Tomada de: Svarouvsky, 1979.

3.3.3. Filtros de Lecho Profundo

Debido a la optimización de los bioprocesos, las soluciones a filtrar presentan cada vez mayores concentraciones celulares, de restos celulares y de coloides. Por otro lado, las tolerancias necesarias para manejar la variabilidad de los procesos puede requerir filtros de varios cientos de metros cuadrados adicionales de área de filtración. Por esta razón, el uso de centrífugas para remover células en combinación con filtros de lecho profundo para remover coloides y restos celulares es una práctica cada vez más generalizada, ya que puede ayudar a extender la capacidad de los filtros para esterilización situados corriente abajo (Anderson, 2009; Lutz *et al.,* 2009).

Los principales materiales que se utilizan en los FLP son las tierras diatomeas, perlitas, fibras de celulosa y resinas cargadas positivamente (para eliminar DNA, endotoxinas y virus cargados negativamente). La remoción de partículas ocurre por varios mecanismos como atrapamiento físico, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas (Roush y Lu, 2008).

Una manera de emplear menos mano de obra es el uso de filtros modulares, apilados o lenticulares con elementos tipo disco o cassete, que se venden preensamblados y se colocan de acuerdo a las necesidades de filtración en sus respectivos recipientes (Fig. 3.7 a y b). Alternativamente se utilizan los filtros tipo cápsulas que no requieren recipientes especiales (Fig. 3.7c).

Los filtros modulares tipo cassete son capaces de soportar adecuadamente

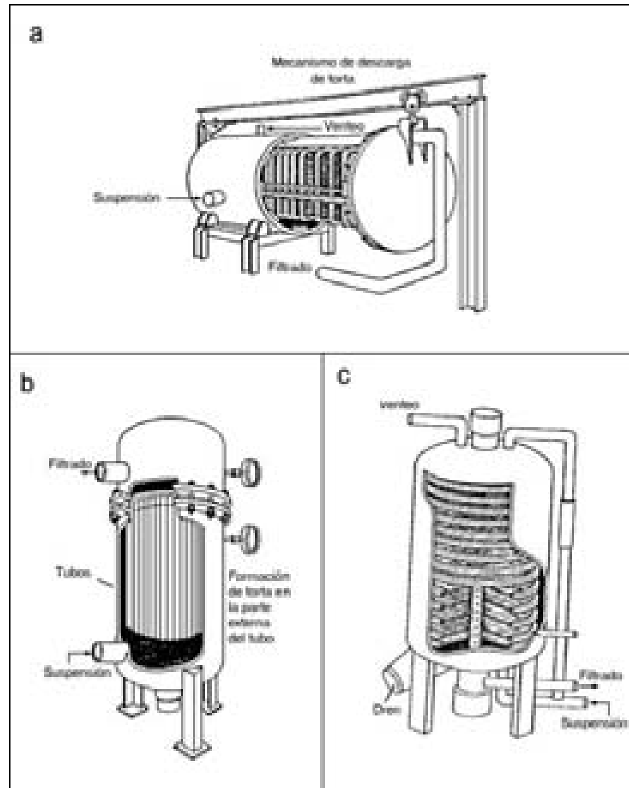


Figura 3.5: Filtros intermitentes de cámara con elementos filtrantes. a) Filtro horizontal de hojas verticales, b) Filtro tubular vertical y c) Filtro de hojas. Tomada de: Svarouvsky, 1979.

los cambios de presión y son utilizados para filtrar bacterias y levaduras en el rango de 10 a 12,000 L (Jornitz y Meltzer, 2008). Los elementos se colocan en forma vertical y están diseñados con multicapas, de tal manera que la filtración se realiza de las capas más gruesas hacia las más delgadas (Fig. 3.8).

3.4. Diseño de Equipo de Filtración

En esta sección se centra la atención en el uso de la teoría fundamental de la filtración en el diseño de tres tipos de filtros:

- Filtros por lotes
- Filtros Continuos
- Filtros de Lecho Profundo

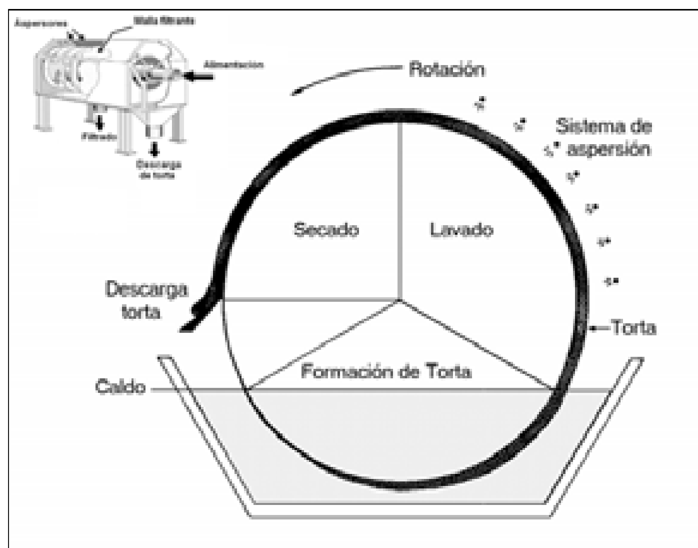


Figura 3.6: Vista lateral de filtro continuo tipo tambor.

3.4.1. Filtración por Lotes

En la filtración por lotes con formación de torta la separación depende de varios factores dentro de los que destacan la permeabilidad de la torta que forme el sólido que se desea separar, el tamaño del poro de la torta, el tamaño de la partícula del sólido y la compresibilidad de la torta.

Desde el punto de vista de los parámetros de operación dos tipos particulares de filtración por lotes son industrialmente importantes (Brown, 1982): a) la filtración por lotes con caída de presión constante y b) la filtración por lotes a flujo constante.

En la filtración por lotes con caída de presión constante, se produce una disminución gradual del flujo conforme aumenta el espesor de la torta. Este tipo de filtración es especialmente útil en la adquisición experimental de datos para diseño, ya que el seguimiento del volumen del filtrado con el tiempo es relativamente fácil de medir. La filtración por lotes a flujo constante se produce debido a que algunos tipos de bombas producen el mismo flujo a diferentes cabezales.

Tanto en el caso de la filtración por lotes a caída de presión constante, como en la de flujo constante, la resistencia de la torta varía conforme avanza el tiempo de filtración al irse acumulando sólidos. Sin embargo, la resistencia específica de la torta puede ser variable o no. Esta variación depende de la naturaleza de la torta.

El análisis general de la filtración por lotes que se desarrolla en este capítulo, inicia con el tratamiento de tortas incompresibles cuya resistencia específica

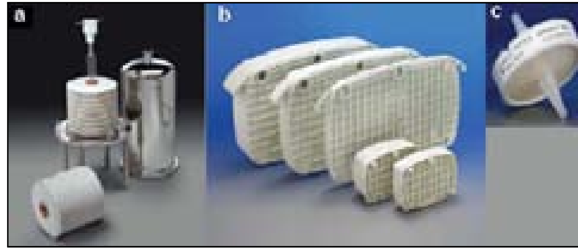


Figura 3.7: Filtros de lecho profundo de uso en bioprocesos. a) Discos apilados, b) Cassetes y c) Cápsulas.

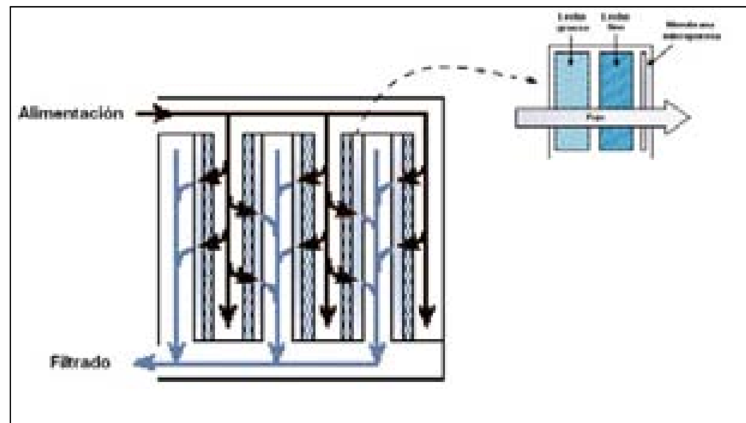


Figura 3.8: Diagrama de operación de un elemento tipo cassete de un filtro modular. En el detalle se presenta el diseño multicapa.

es constante. Posteriormente este tratamiento se aplica al caso particular de tortas compresibles, las cuales son características de materiales biológicos. Este desarrollo sólo será referido al caso en el cual la caída de presión es constante.

Filtración por lotes: Tortas incompresibles y ΔP constante

En el caso de tortas incompresibles la resistencia de la torta puede suponerse directamente proporcional a la cantidad de sólidos (peso seco) depositados por unidad de área de filtración. Esto puede expresarse como:

$$R_t = \alpha w \tag{3.11}$$

donde w es la cantidad de sólidos base seca depositados por unidad de área y α es la resistencia específica de la torta. La ecuación (3.11) puede ser expresada en términos de parámetros más fácilmente medibles:

$$R_t = \alpha \rho_o \left(\frac{V}{A} \right) \tag{3.12}$$

donde ρ_o es la cantidad de masa sólida seca por unidad de volumen libre de sólidos (o volumen de filtrado).

Combinando las ecuaciones (3.5) y (3.12) se tiene:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{A \, \Delta P}{\mu \left[\alpha \rho_o \left(\frac{V}{A} \right) + R_m \right]} \tag{3.13}$$

La ecuación (3.13) puede escribirse en su forma recíproca, e integrarla con las siguientes condiciones iniciales:

$$\text{para} \qquad t = 0 \qquad V = 0$$

y obtener la siguiente ecuación:

$$\frac{A \, t}{V} = \left(\frac{\mu \alpha \rho_o}{2 \Delta P} \right) \frac{V}{A} + \frac{\mu \, R_m}{\Delta P} \tag{3.14}$$

La ecuación (3.14) puede ser utilizada para la obtención de parámetros de filtración en equipos por lotes a presión constante. Cuando se gráfica At/V vs V/A se produce una línea recta con:

$$\text{Pendiente} = \left(\frac{\mu \alpha \rho_o}{2 \Delta P} \right)$$

$$\text{Ordenada en el origen} = \frac{\mu \, R_m}{\Delta P}$$

Un caso particular de la ecuación (3.14) se presenta cuando la resistencia del medio es despreciable, entonces la ordenada en el origen toma el valor de cero y la ecuación se reduce a:

$$\frac{A \, t}{V} = \left(\frac{\mu \alpha \rho_o}{2 \Delta P} \right) \frac{V}{A} \tag{3.15}$$

Otro caso particular de la filtración por lotes con caída de presión constante se produce cuando se desea asegurar una formación uniforme de la torta evitando flujos altos al inicio de una corrida, que inducen la penetración de sólidos sobre el medio filtrante. En este caso la caída de presión se incrementa gradualmente hasta alcanzar una caída de presión constante (Fig. 3.9).

Bajo estas condiciones la integración de la ecuación (3.13) se efectúa en el rango de caída de presión constante, con las condiciones iniciales

$$\text{para} \quad t = t_s \qquad V = V_s$$

y se obtiene la ecuación:

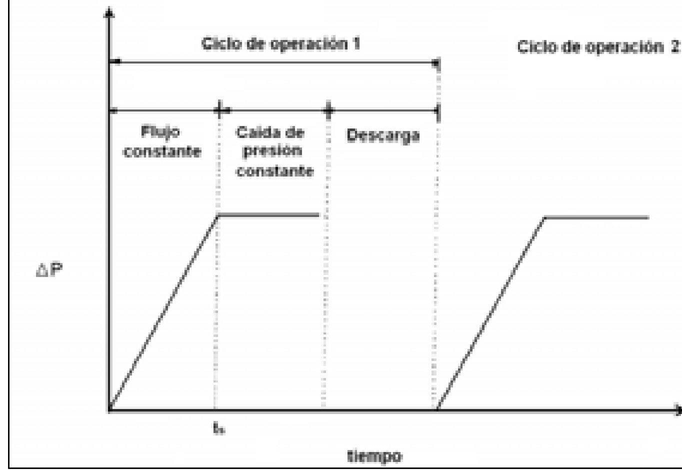


Figura 3.9: Caída de presión contra tiempo en una filtración intermitente.

$$\frac{(t-t_s)\ A}{(V-V_s)} = \frac{\mu\alpha\rho_o}{2\Delta P}\frac{(V+V_s)}{A} + \frac{\mu\ R_m}{\Delta P} \tag{3.16}$$

Esta ecuación nos permite calcular parámetros experimentales al graficar:

$$\frac{(t-t_s)\ A}{(V-V_s)} \qquad \text{vs} \qquad \left(\frac{V+V_s}{A}\right)$$

Ejemplo 3.1. Filtración de actinomicetos.

Es bien conocido que los cultivos de actinomicetos como el *Streptomyces griseus* presentan una gran resistencia a la filtración (Aiba *et al.*, 1972). En una filtración por lotes a presión constante con un filtro de laboratorio de 110 cm^2 de área y una caída de presión de 70,000 N/m^2, se procesa un caldo de una concentración de 0.015 kg/L peso seco de células y una viscosidad de 0.0011 N-s/m^2 (el caldo se adicionó con 1 % de tierras diatomeas, a un pH de 3.7 y una temperatura de 10 °C), obteniéndose los datos que aparecen en la Tabla 3.2.

Se pide: Estimar la resistencia específica de la torta α y la resistencia del medio R_m.

Solución:

Del análisis de los datos se desprende que la resistencia del medio es despreciable, de tal manera que se realiza un ajuste del modelo lineal dado por la ecuación (3.14) a los datos, con una restricción de la ordenada en el origen . El programa MATLAB para realizar el ajuste se presenta en la Figura 3.10.

En la Figura 3.11 se presenta el resultado del programa, la línea continua es una recta ajustada que pasa por el origen.

a) Cálculo de la resistencia del medio.

Tabla 3.2: Datos de filtración del Ejemplo 3.1.

Datos	
t (s)	V (cm^3)
19	100
80	200
210	300
380	400
700	500
978	600
1215	650

De acuerdo a la Figura 3.11 la ordenada en el origen es cero y por lo tanto la resistencia del medio no tiene un valor significativo:

$$R_m = 0$$

b) Cálculo de la resistencia específica de la torta.

De acuerdo al resultado del inciso a) se utiliza la ecuación (3.14) para calcular la resistencia específica de la torta.

$$\text{Pendiente} = \frac{\mu\alpha\rho_o}{2\Delta P}$$

$$32.52\ \frac{\text{s}}{\text{cm}^2} = \frac{\left(0.0011\ \frac{\text{N}-\text{s}}{\text{m}^2}\right)(\alpha)\left(0.015\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)}{2\times 70,000\ \frac{\text{N}}{\text{m}^2}}$$

$$\alpha = \frac{32.52\ \frac{\text{s}}{\text{cm}^2}\times 140,000}{0.0011\times 0.015\ \frac{\text{g}-\text{s}}{\text{cm}^3}} = 3.035\times 10^{11}\ \frac{\text{cm}}{\text{g}}$$

Ejemplo 3.2. Escalamiento de la filtración de levaduras.

En la filtración de un caldo de levaduras a presión constante se obtuvieron los datos que se presentan en la Tabla 3.3.

El área del filtro utilizado fue de 0.28 m^2. La suspensión contiene 1.92 kg/m^3 de masa seca y una viscosidad de 0.0029 kg/m-s. La resistencia específica de la torta formada es de 4.0 $\times 10^{10}$ m/kg.

Se pide determinar:

a) La caída de presión en el filtro, ΔP.

b) La resistencia del medio filtrante, R_m.

c) El área de filtración necesaria para procesar 4,000 L de caldo en 20 min, utilizando la misma caída de presión.

```
% Bioseparaciones 2da Edicion
% Ejemplo_3.1 Filtración de actinomicetos.
% Nombre del archivo ejemplo_3.1
clear
clf
% Entrada de datos
% área (cm2)
af=110;
t=[19 80 210 380 700 978 1215];
v=[100:100:600 650];
% Cálculos
atsv=af*t./v;
vsa=v/af;
% Ajuste de datos con restricción de la ordenada
pend=sum(vsa.*atsv)/sum(vsa.^2);
% Evaluación del modelo
matsv=pend*vsa;
%Cálculo de r2
d=atsv-matsv;
r2 = 1 - sum(d.^2) / sum((atsv - mean(atsv)).^2);
% Impresión de resultados
plot(vsa, atsv, 'b*',vsa, matsv, 'k-', 0, 6, 0, 220)
xlabel('V/A (cm)')
ylabel('At/V (s/cm)')
title('Ejemplo 3.1')
pend1 = num2str(pend);
r21=num2str(r2);
eccad = ['y = ', pend1, 'x'];
r2cad = ['r^2 = ',r21];
text(4,210,eccad)
text(4,190,r2cad)
```

Figura 3.10: Programa MATLAB para la solución del Ejemplo 3.1.

Solución:

Del análisis de los datos se desprende que la resistencia del medio es despreciable, de tal manera que se realiza un ajuste del modelo lineal dado por la ecuación (3.14) a los datos. El programa MATLAB para realizar el ajuste se presenta en la Figura 3.12.

En la Figura 3.13 se presenta el resultado del programa, la línea continua es una recta ajustada.

a) Cálculo de la caída de presión en el filtro, ΔP.

De la pendiente de la gráfica se tiene que:

$$\frac{\mu\alpha\rho_o}{2\Delta P} = 329.51\ \frac{\text{s}}{\text{m}^2} = \frac{0.0029\ \dfrac{\text{kg}}{\text{m}-\text{s}} \times 4.0\ \times 10^{10}\ \dfrac{\text{m}}{\text{kg}} \times 1.92\ \dfrac{\text{kg}}{\text{m}^3}}{2\Delta P}$$

$$\Delta P = \frac{0.0029\ \dfrac{\text{kg}}{\text{m}-\text{s}} \times 4.0\ \times 10^{10}\ \dfrac{\text{m}}{\text{kg}} \times 1.92\ \dfrac{\text{kg}}{\text{m}^3} \times \dfrac{\text{N}}{\dfrac{\text{kg}-\text{m}}{\text{s}^2}}}{2 \times 329.51\ \dfrac{\text{s}}{\text{m}^2}} = 3.38 \times 10^5\ \frac{\text{N}}{\text{m}^2}$$

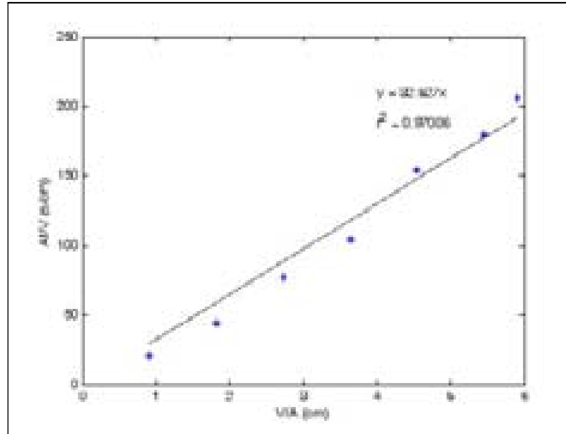


Figura 3.11: Ajuste lineal de los datos de filtración del Ejemplo 3.1.

Tabla 3.3: Datos del Ejemplo 3.2.

Datos	
t (min)	V (L)
4	115
20	365
48	680
76	850
120	1130

b) Cálculo de la resistencia del medio

$$\frac{\mu\ R_m}{\Delta P} = 456.33\ \frac{\mathrm{s}}{\mathrm{m}} = \frac{0.0029\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m\text{-}s}} \times R_m}{3.38 \times 10^5\ \dfrac{\mathrm{N}}{\mathrm{m}^2} \times \dfrac{\mathrm{kg} - \dfrac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}^2}}{\mathrm{N}}}$$

$$R_m = \frac{456.33\ \dfrac{\mathrm{s}}{\mathrm{m}} \times 3.38 \times 10^5\ \dfrac{\mathrm{N}}{\mathrm{m}^2} \times \dfrac{\dfrac{\mathrm{kg} - \mathrm{m}}{\mathrm{s}^2}}{\mathrm{N}}}{0.0029\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m} - \mathrm{s}}} = 5.31\ \times 10^{10}\ \mathrm{m}^{-1}$$

c) Cálculo del área a la nueva escala. Utilizando la ecuación (3.14),

```
% Bioseparaciones 2da Edicion
% Ejemplo_3.2 Escalamiento de la filtración de levaduras.
% Nombre del archivo ejemplo_3.2
clear
clf
% Entrada de datos
% área (m2)
af=0.28;
t=[4 20 48 76 120];
t=60*t;
v=[115 365 680 850 1130];
v=0.001*v;
% Cálculos
atsv=af*t./v;
vsa=v/af;
% Ajuste de datos
coef=polyfit(vsa,atsv,1);
% Evaluación del modelo
matsv=polyval(coef,vsa);
%Cálculo de r2
d=atsv-matsv;
r2 = 1 - sum(d.^2) / sum((atsv - mean(atsv)).^2);
% Impresión de resultados
plot(vsa, atsv, 'b*',vsa, matsv, 'k-',0,4,0,2000)
xlabel('V/A (m)')
ylabel('At/V (s/m)')
title('Ejemplo 3.2')
pend = num2str(coef(1));
ord = num2str(coef(2));
r21=num2str(r2);
eccad = ['y = ', pend, 'x + ', ord];
r2cad = ['r^2 = ',r21];
text(2,1800,eccad)
text(2,1700,r2cad)
```

Figura 3.12: Programa MATLAB para el ánalisis por regresión lineal de los datos del Ejemplo 3.2.

$$\frac{(A)\,(20\text{ min})\left(\dfrac{60\text{ s}}{\text{min}}\right)}{(4000\text{ L})\left(\dfrac{\text{m}^3}{10^3\text{ L}}\right)} = \left(329.51\ \frac{\text{s}}{\text{m}^2}\right)\left(\frac{4000\text{ L}}{A}\right)\left(\frac{\text{m}^3}{10^3\text{ L}}\right) + 456.33\ \left(\frac{\text{s}}{\text{m}}\right)$$

$$A = 3.0\text{ m}^2$$

Optimización de la filtración por lotes En la filtración por lotes se presenta un problema de optimización relacionado con el tiempo de duración de cada ciclo o tiempo de procesamiento de un lote de caldo. Si el tiempo de duración de cada ciclo de filtración se acorta, el tiempo total de descarga y limpieza del filtro se incrementa. Por otro lado, conforme se incrementa el tiempo del ciclo de

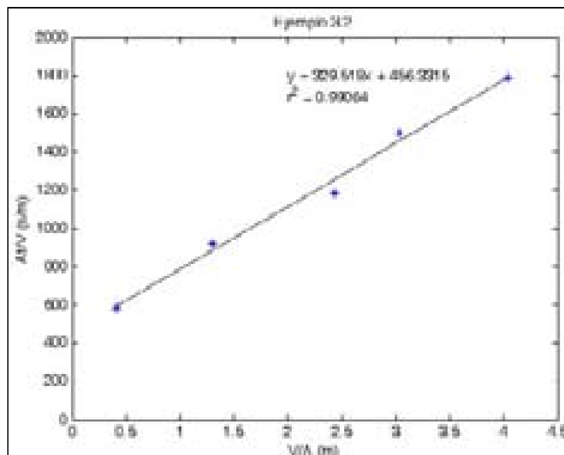


Figura 3.13: Ajuste lineal de los datos de filtración del Ejemplo 3.2.

filtración, la velocidad de filtración promedio disminuye. En el siguiente ejemplo se aborda este tipo de problema.

Ejemplo 3.3. Cálculo del número de ciclos óptimo para una filtración por lotes.

En el procesamiento de un caldo micelial para la recuperación de un antibiótico en un filtro de laboratorio de 110 cm^2 de área a una presión de 19.6×10^4 N/m^2, se obtuvieron los datos que aparecen en las columnas 1 y 2 de la Tabla 3.4. La viscosidad del caldo fue de 2×10^{-3} $\text{N}-\text{s/m}^2$ y la masa de sólidos secos por unidad de volumen de filtrado de 40 kg/m^3.

Tabla 3.4: Datos y cálculos de Ejemplo 3.3.

Datos		Cálculos	
t (s)	$V \times 10^4$ m^3	At/V (s/m)	V/A (m)
9	1.0	990.0	0.009
46	2.0	2530.0	0.018
126	3.0	4620.0	0.027
240	4.0	6600.0	0.036
405	5.0	8910.0	0.045
610	6.0	11183.3	0.055
860	7.0	13514.3	0.064

Se pide estimar:

a) La resistencia específica del caldo α.

b) El número de ciclos del filtro por día, si cada operación de descarga y limpieza del filtro tiene una duración de 0.5 h y el filtro opera 24 h al día.

Solución:

a) De acuerdo a la ecuación (3.14), a partir de los datos es necesario calcular los grupos At/V y V/A. Estos cálculos se presentan en las columnas 3 y 4 de la Tabla 3.4. Mediante una regresión lineal con restricción de la ordenada en el origen, es posible obtener la pendiente de los datos ajustados a dicha ecuación,

$$\alpha = \frac{(\text{pendiente})(2)(\Delta P)}{\mu\rho_o}$$

$$\alpha = \frac{\left(198,440\ \frac{\text{s}}{\text{m}^2}\right)(2)\left(19.6\times 10^4\ \frac{\text{N}}{\text{m}^2}\right)}{\left(2\times 10^{-3}\ \frac{\text{N}-\text{s}}{\text{m}^2}\right)\left(40\ \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}\right)} = 9.7\times 10^{11}\ \frac{\text{m}}{\text{kg}}$$

b) El número de ciclos por día está dado por:

$$\text{Número de ciclos} = \frac{24\ \text{h}}{t_c + 0.5}$$

donde t_c es el tiempo de filtración por ciclo.

El volumen total de filtrado V_t se relaciona con el volumen de filtrado por ciclo V_c mediante la siguiente expresión:

$$V_t = \left(\frac{24\ \text{h}}{0.5 + t_c}\right)V_c$$

la resistencia del medio filtrante puede ser despreciada, entonces puede ser utilizada la ecuación (3.15) para obtener:

$$V_c = \left(\frac{2A^2 t_c \Delta P}{\mu\alpha\rho_o}\right)^{\frac{1}{2}}$$

de tal manera que:

$$V_t = \left(\frac{24}{t_c + 0.5}\right)\left(\frac{2A^2 t_c \Delta P}{\mu\alpha\rho_o}\right)^{\frac{1}{2}}$$

derivando la expresión anterior con respecto al tiempo del ciclo e igualando el resultado a cero, se obtiene el tiempo de duración del ciclo para el cual el volumen total de filtrado es máximo, es decir:

$$\frac{dV_t}{dt} = \frac{d}{dt_c}\left(\frac{\sqrt{t_c}}{t_c + 0.5}\right) = -\left(\frac{1}{2\sqrt{t_c^*}}\right)\frac{(t_c^* - 0.5)}{(t_c^* + 0.5)^2} = 0$$

el tiempo óptimo t_c^* es:

$$t_c^* = 0.5\ \text{h}$$

el número de ciclos por día está dado por:

$$\text{Número de ciclos} = \frac{24\ \text{h}}{0.5\ \text{h} + 0.5\ \text{h}} = 24\ \text{ciclos}$$

Filtración por lotes en paralelo En el caso de los filtros de marcos y placas, cada marco consta de dos caras de filtración. La alimentación a cada marco se hace de manera independiente de tal manera que cada superficie de filtración actúa en paralelo respecto al flujo de alimentación. Debido a lo anterior los datos de diseño de este tipo de filtros pueden ser generados en un filtro por lotes de laboratorio. El siguiente ejemplo se refiere a este procedimiento.

Ejemplo 3.4. Filtración de cristales de un esteroide.

Con los datos de una filtración de laboratorio de una suspensión de un esteroide se desea diseñar un filtro por lotes de marcos y placas.

Las pruebas de laboratorio se realizan en un tubo de vidrio con una malla en el extremo inferior de resistencia despreciable. Los datos de los resultados del laboratorio son los siguientes:

Peso seco de los cristales	0.063 kg
Volumen de la torta	253 cm^3
Profundidad de la torta	12.5 cm
Tiempo de filtración	9,780 s
Gradiente de presión	1.01 kg/cm^2
Torta incompresible	sí

Se pide:

Estimar el número de marcos de $430 \times 430 \times 30$ mm y el tiempo de filtración para procesar 40 kg/lote de peso seco de producto. Suponer que la bomba de alimentación produce una presión a la entrada del filtro de 0.68 kg/cm^2 y que descarga a la atmósfera.

Solución:

a) Estimación de parámetros a partir de datos de laboratorio.

De acuerdo con los datos de laboratorio es necesario utilizar la ecuación (3.15) arreglada de la siguiente forma:

$$\frac{\mu\alpha}{2\rho_o} = \frac{t\Delta P A^2}{W^2}$$

donde $W = \rho_o V$ es el peso seco de la torta.

Sustituyendo valores en la expresión anterior se obtiene:

$$\frac{\mu\alpha}{2\rho_o} = \frac{(9,780\ \text{s})\left(1.01\ \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}\right)\left(\frac{253}{12.5}\right)^2\ \text{cm}^4}{(0.063\ \text{kg})^2} = 1.01 \times 10^9\ \frac{\text{s} - \text{cm}^2}{\text{kg}}$$

b) Cálculo del número de marcos necesarios para la filtración de 40 kg peso seco del esteroide.

El cálculo se basa en el hecho que el volumen de todos los marcos del filtro debe ser lo suficiente grande para alojar el volumen de la torta húmeda, de tal manera que:

$$\begin{aligned} \text{Número de marcos} &= \frac{\text{volumen torta húmeda}}{\text{volumen de un marco}} \\ \text{Número de marcos} &= \frac{(40 \text{ kg})\left(\dfrac{253 \text{ cm}^3}{0.063 \text{ kg}}\right)}{(43 \times 43 \times 3) \text{ cm}^3} = 29 \end{aligned}$$

c) Cálculo del área de filtración del filtro prensa.

El área de filtración para filtros prensa de marcos se calcula tomando en cuenta que por cada marco existen dos placas o superficies de filtración.

$$\begin{aligned} \text{Área de filtración} &= \text{Área por marco} \times 2 \times \text{Número de marcos} \\ \text{Área de filtración} &= (43 \times 43) \text{ cm}^2 \times 2 \times 29 = 107,242 \text{ cm}^2 \end{aligned}$$

d) Cálculo del tiempo de filtración en el filtro prensa.

El tiempo de filtración puede ser calculado mediante la modificación de la ecuación (3.15),

$$\begin{aligned} t &= \left(\frac{\mu\alpha}{2\rho_o}\right)\frac{W^2}{\Delta P A^2} \\ t &= \left(1.01 \times 10^9 \ \frac{\text{s} - \text{cm}^2}{\text{kg}}\right) \times \frac{(40 \text{ kg})^2}{\left(0.68 \ \dfrac{\text{kg}}{\text{cm}^2}\right) \times (107,242 \text{ cm}^2)^2} = 206 \text{ s} \end{aligned}$$

Filtración por lotes: Tortas compresibles y ΔP constante

La compresibilidad de una torta se caracteriza por un aumento de su resistencia específica al aumentar el gradiente de presión que actúa sobre la torta.

La mayoría de las tortas de material biológico son compresibles. En estos casos la resistencia específica puede ser correlacionada con el gradiente de presión mediante la siguiente ecuación empírica (Silverblatt *et al.*, 1974):

$$\alpha = \alpha' \Delta P^s \tag{3.17}$$

donde α' es una constante relacionada principalmente con el tamaño y forma de las partículas de la torta y s es el índice de compresibilidad. Éste varía de

cero para una torta incompresible, a 0.8 para una torta altamente compresible (la correlación es aceptable para $s \leq 0.6$ y $\Delta P \geq 0.2$ atm).

La determinación experimental de s y α' requiere la realización de varias corridas de filtración a caída de presión constante a varios niveles. Los datos pueden ser correlacionados en una gráfica $\log(\alpha)$ vs $\log(\Delta P)$. Entre mayor sea el valor de s el efecto de la presión sobre la resistencia de la torta es más severo, en estos casos es recomendable utilizar ayudas-filtro.

Combinando las ecuaciones (3.14) y (3.17) se puede obtener la ecuación para describir la filtración por lotes de tortas compresibles con caída de presión constante:

$$\frac{A\ t}{V} = \left(\frac{\mu \alpha' \rho_o}{2\Delta P^{1-s}}\right)\frac{V}{A} + \frac{\mu\ R_m}{\Delta P} \tag{3.18}$$

Ejemplo 3.5. Cálculo del índice de compresibilidad.

Se desea correlacionar la resistencia específica de la torta que forma una levadura con la caída de presión, para lo cual se realizan pruebas de filtración bajo las siguientes condiciones:

Área de filtración	9.3 cm^2
Viscosidad	0.001 $N{-}s/m^2$
Masa de sólido seco por volumen de filtrado	10 g/L

Las pruebas se realizan a cuatro diferentes gradientes de presión. Los datos de cada corrida fueron correlacionados mediante la ecuación (3.14) obteniéndose los siguientes resultados:

Corrida Núm.	ΔP atm	Ordenada Origen s/cm.	Pendiente s/cm^2
1	0.68	26	3.00
2	1.36	12	2.00
3	2.04	8	1.60
4	3.40	5	1.10

Se pide: Estimar el índice de compresibilidad s para este material.

Solución:

El empleo de la ecuación (3.17) permite calcular el índice de compresibilidad, para lo cual es necesario el cálculo de α para cada corrida mediante la ecuación (3.14),

$$\text{Pendiente} = \frac{\mu \alpha \rho_o}{2\Delta P}$$

Para la primera corrida se tiene:

$$3\ \frac{\mathrm{s}}{\mathrm{cm}^2} = \frac{\left(0.001\ \dfrac{\mathrm{N-s}}{\mathrm{m}^2}\right)\times \alpha_1 \times \left(10\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m}^3}\times\dfrac{1000\ \mathrm{g}}{\mathrm{kg}}\times\dfrac{\mathrm{m}^3}{10^6\ \mathrm{cm}^3}\right)}{2\times\left(0.68\ \mathrm{atm}\times\dfrac{1.0133\times 10^5\ \dfrac{\mathrm{N}}{\mathrm{m}^2}}{\mathrm{atm}}\right)}$$

$$\alpha_1 = 4.13\times 10^{10}\ \frac{\mathrm{cm}}{\mathrm{g}}$$

De igual manera pueden obtenerse los valores de α_2, α_3 y α_4 que aparecen en la tabla siguiente:

Corrida Número	ΔP (atm)	α (cm/g)
1	0.68	4.13×10^{10}
2	1.36	5.51×10^{10}
3	2.04	6.61×10^{10}
4	3.40	7.58×10^{10}

Los datos de α y ΔP para cada una de las corridas pueden ser correlacionados de acuerdo con la ecuación (3.17) en una gráfica $\log(\Delta P)$ vs $\log(\alpha)$, tal como aparecen en la Figura 3.14. Con la pendiente de la curva se puede estimar el valor del índice de compresibilidad:

$$s = 0.38$$

3.4.2. Filtración Continua

En esta sección se aborda el diseño de los filtros continuos con tortas compresibles que es el caso más común para las filtraciones de caldos biológicos a gran escala. En un filtro continuo (Fig. 3.6) el ciclo de filtración consta de tres pasos principales: a) formación de la torta, b) lavado de la torta y c) descarga de la torta. Los primeros dos pasos se relacionan con el proceso de filtración y el tercero es un aspecto de diseño mecánico. Esta sección enfatiza lo referente a los dos primeros pasos.

Formación de la torta

En los procesos de filtración por lotes el área de filtración es constante y el espesor de la torta varía con el tiempo de filtrado. En la filtración continua se puede suponer que el espesor de la torta es constante y el área de filtración varía con el tiempo.

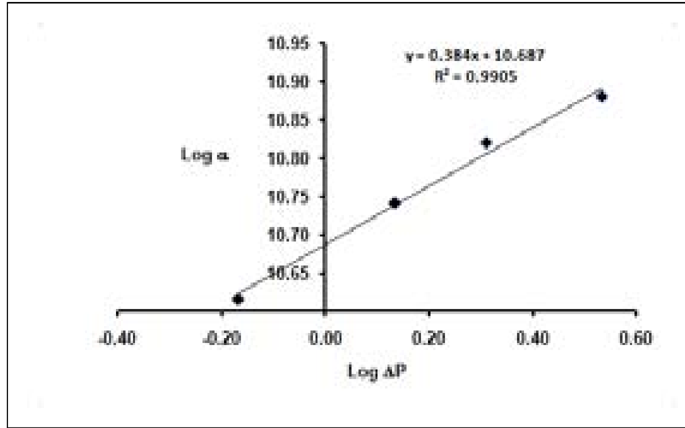


Figura 3.14: Solución gráfica del Ejemplo 3.4. Resistencia específica contra caída de presión (log-log).

La ecuación (3.18) puede ser adaptada a la filtración continua. Esta ecuación, cuando la resistencia del medio es despreciable, puede ser expresada como:

$$\frac{A\ t_f}{V_f} = \left(\frac{\mu\alpha'\rho_o}{2\Delta P^{1-s}}\right)\frac{V_f}{A} \tag{3.19}$$

donde t_f es el tiempo que dura un paso de la formación de la torta y V_f es el volumen de filtrado colectado en ese periodo. A es el área expuesta de filtración por ciclo o por revolución. Esta ecuación es útil para diseño de filtros continuos a partir de datos de filtración por lotes.

La ecuación (3.19) puede ser expresada en términos de los parámetros de diseño siguientes:

Q: Flujo de filtrado. $[L^3/t]$.

ϕ: Ángulo de formación de la torta. $[rad]$.

N: Velocidad angular del tambor. $[\ t^{-1}]$.

R: Radio del tambor. $[L]$.

L: Longitud del tambor. $[L]$.

Entonces es posible relacionar el volumen de filtrado de un ciclo por unidad de área, con el gasto Q:

$$\frac{V_f}{A} = \frac{Q}{2\pi RLN} \tag{3.20}$$

donde

$$2\pi RL = \text{Área lateral del filtro}$$

El tiempo que dura cada etapa de filtración se puede relacionar con el ángulo de filtración y la velocidad de giro del tambor, mediante la ecuación siguiente:

$$t_f = \frac{\phi}{2\pi N} \tag{3.21}$$

Combinando las ecuaciones (3.19), (3.20) y (3.21) se obtiene el flujo de filtración:

$$Q = RL\left(\frac{4\pi\phi N\Delta P^{1-s}}{\mu\alpha'\rho_o}\right)^{1/2} \tag{3.22}$$

o en términos de la velocidad de formación de la torta $W_t = \rho_o Q$:

$$W_t = RL\left(\frac{4\pi\phi N\Delta P^{1-s}\rho_o}{\mu\alpha'}\right)^{1/2} \tag{3.23}$$

Las ecuaciones (3.22) y (3.23) pueden ser utilizadas para predecir cambios de la velocidad de filtración con respecto a cambios de las variables de diseño y operación en filtros continuos al vacío.

Lavado de la torta

Una vez que se ha formado la torta sobre la superficie del filtro, mediante un lavado se remueve del soluto retenido en el líquido y en la masa celular de la torta. Existen diferentes técnicas de lavado, siendo la más utilizada la de lavado por desplazamiento. En esta técnica el líquido de lavado se aplica directamente sobre la superficie de la torta.

Las curvas de lavado, donde se grafica la concentración adimensional de soluto a la salida de la torta (C/C_0) contra los volúmenes de lavado (o el tiempo de lavado), permiten analizar las operaciones de lavado (Fig. 3.15). En el caso ideal donde sólo existe el desplazamiento hidráulico, únicamente se requiere un volumen de lavado para recuperar todo el soluto. En la práctica, inicialmente el líquido de lavado produce un desplazamiento hidráulico del filtrado retenido por la torta. Si el lavado continúa parte del soluto contenido en el interior de la biomasa puede pasar al líquido de lavado mediante mecanismos de transferencia de masa.

En la etapa de lavado la cantidad de solutos que puede ser recuperada depende del volumen del líquido de lavado que se emplee. Un factor de diseño es el tiempo requerido para aplicar el líquido de lavado o tiempo de lavado, el cual depende de la naturaleza de la torta. Debido a lo anterior el análisis de la etapa de lavado se efectúa en dos pasos: a) cálculo del volumen de lavado en función de la recuperación de soluto que se especifique y b) cálculo del tiempo de lavado necesario en función del tipo de torta.

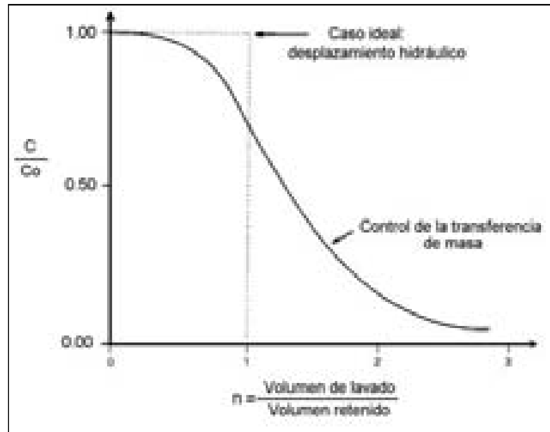


Figura 3.15: Curva y mecanismos de lavado.

Cálculo del volumen del líquido de lavado Si el desplazamiento por lavado del líquido retenido en la torta extrajera todo el soluto, el volumen necesario de líquido de lavado sería equivalente al volumen del líquido retenido por la torta (fracción vacía del lecho). La operación de lavado sería 100 % eficiente. Sin embargo, debido a los fenómenos de difusión y mezclado en el lecho, esto no ocurre en la práctica.

Conforme la eficiencia de lavado disminuye debido a los mecanismos de difusión y mezclado, para lograr una determinada extracción del soluto, la razón del volumen del líquido de lavado al volumen de líquido retenido se incrementa.

Existen varios análisis teóricos para correlacionar los parámetros de lavado, pero debido a lo complejo del fenómeno frecuentemente se utilizan correlaciones empíricas que ofrecen buenos resultados. Una correlación empírica que ha sido utilizada para materiales biológicos está dada por la siguiente ecuación (Choudhury y Dahlstrom, 1957):

$$r = (1 - \varepsilon)^n \tag{3.24}$$

donde:

$$r = \frac{\text{Masa de soluto retenido en torta}}{\text{Masa de soluto inicial en la torta}}$$

ε = Eficiencia de lavado.

$$n = \frac{\text{Volumen de líquido de lavado}}{\text{Volumen del líquido retenido por la torta}}$$

La ecuación (3.24) puede ser utilizada en gráficas semilogarítmicas para correlacionar datos de lavado (Fig. 3.16). Con estas correlaciones es posible calcular el líquido de lavado necesario para lograr un determinado por ciento de extracción.

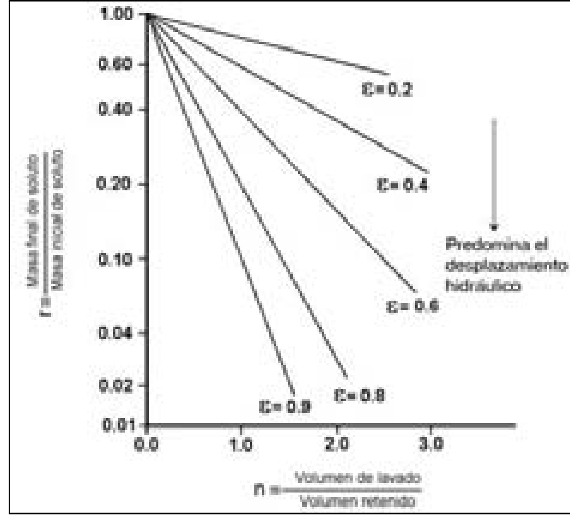


Figura 3.16: Curvas de tasa de lavado en escala semilogarítmica.

Cálculo del tiempo de lavado Para el cálculo del tiempo de lavado se puede suponer que el gasto durante la fase de lavado es constante dado que el líquido de lavado no tiene sólidos. Este gasto puede igualarse al gasto final de la fase de filtrado. Con base a lo anterior, la ecuación (3.13) con $R_m = 0$ y $\alpha = \alpha' \Delta P^s$ se escribe:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{A \Delta P^{1-s}}{\mu \alpha' \rho_o \frac{V}{A}} \tag{3.25}$$

El gasto cuando $V = V_f$ es constante e igual a:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{A^2 \Delta P^{1-s}}{\mu \alpha' \rho_o V_f} \tag{3.26}$$

Integrando la ecuación (3.26) entre los límites:

$$t = 0 \qquad V = 0$$

$$t = t_L \qquad V = V_L$$

donde V_L es el volumen del líquido de lavado y t_L es el tiempo de lavado requerido, se obtiene la siguiente ecuación:

$$V_L = \left(\frac{A^2 \Delta P^{1-s}}{\mu \alpha' \rho_o V_f} \right) t_L \tag{3.27}$$

Combinando las ecuaciones (3.19) y (3.27) se obtiene:

$$\frac{V_L}{A} = \left[\frac{\Delta P^{1-s}}{2\mu\alpha'\rho_o t_f}\right]^{1/2} t_L \tag{3.28}$$

Los volúmenes y tiempos, de filtrado y lavado, se relacionan directamente mediante las ecuaciones (3.19) y (3.28) obteniéndose:

$$\frac{t_L}{t_f} = 2\frac{V_L}{V_f} \tag{3.29}$$

Es conveniente expresar la ecuación (3.29) en términos de parámetros de diseño, como la relación de volumen de lavado a volumen retenido n, y la fracción del líquido retenido con respecto al volumen del filtrado f, de tal manera que

$$\frac{t_L}{t_f} = 2\frac{V_L}{V_R}\frac{V_R}{V_f} = 2nf \tag{3.30}$$

Ejemplo 3.6. Filtración continua al vacío.

Se dispone de un filtro tipo tambor rotatorio continuo de 3.0 m de diámetro y 4.3 m de largo, el cual puede ser operado a 1.2 rpm con un ángulo de filtración efectiva de 65°. Con este filtro se desea separar un caldo de eritromicina. El caldo pretratado se puede suponer que forma una torta incompresible. La resistencia del medio filtrante es muy pequeña comparada con la resistencia de la torta. El filtro opera a 51 cm de mercurio de vacío. Bajo estas condiciones:

$$\frac{\mu\alpha\rho_o}{2\Delta P} = 29 \ \frac{\text{s}}{\text{cm}^2}$$

En el lavado se desea extraer el 99 % de los solutos retenidos en la torta. Debido a las características de la torta se espera un 80 % de eficiencia en el lavado y que la torta retenga 1 % del volumen de filtrado.

Se pide estimar:

a) El tiempo de filtrado.

b) El gasto que puede manejar el filtro.

c) El tiempo de lavado.

Solución:

a) Cálculo del tiempo de filtrado.

La ecuación (3.21) permite estimar el tiempo de filtrado con base a los parámetros del filtro, de tal manera que,

$$t_f = \frac{\phi}{2\pi N} = \frac{\frac{65}{360} \times 2\pi}{2\pi \times \left(\frac{1.2}{\text{min}} \times \frac{\text{min}}{60\ s}\right)} = 9 \text{ s}$$

(El ciclo del filtro es de 50 segundos)

b) El gasto que puede manejar el filtro puede ser estimado por medio de la ecuación (3.22).

$$Q = RL\left(\frac{4\pi\phi N\Delta P^{1-s}}{\mu\alpha'\rho_o}\right)^{1/2}$$

por las características de la torta $s = 0$ y $\alpha' = \alpha$, entonces la ecuación anterior se puede expresar como:

$$Q = RL\left(\frac{2\pi\phi N}{\frac{\mu\alpha\rho_o}{2\Delta P}}\right)^{1/2}$$

sustituyendo valores:

$$Q = 150\,\text{cm}\times 430\,\text{cm}\left(\frac{2\pi\times\frac{65}{360}\times 2\pi\times 1.2\ \text{min}^{-1}}{29\ \frac{\text{s}}{\text{cm}^2}\times 60\ \frac{\text{s}}{\text{min}}}\right)^{1/2} = 4,520\ \frac{\text{cm}^3}{\text{s}} = 16,272\ \frac{\text{L}}{\text{h}}$$

c) Cálculo del tiempo de lavado.

Mediante la ecuación (3.24) se calcula n. De acuerdo a los datos del ejemplo:

$$\begin{aligned} r &= (1-\varepsilon)^n \\ 0.01 &= (1-0.8)^n \end{aligned}$$

entonces,

$$n = 2.86\ \frac{\text{Volumen de lavado}}{\text{Volumen retenido}}$$

Aplicando la ecuación (3.30) conociendo que el volumen retenido es 0.01 del volumen del filtrado,

$$t_L = (9\ \text{s})(2)(2.86)(0.01) = 0.5\ \text{s}$$

3.4.3. Filtración de Lecho Profundo

Los FLP se alimentan típicamente por una centrífuga que opera a flujo constante. Conforme el fluido pasa a través del filtro las partículas son removidas y el filtro se va agotando, hasta que eventualmente se empieza a detectar y elevar el nivel de sólidos a la salida del filtro. Paralelamente, la caída de presión en

el lecho se va incrementando. La operación se detiene cuando la concentración de sólidos a la salida del filtro o turbidez alcanza un valor máximo aceptable o punto de ruptura, antes de alcanzar su caída de presión máxima (operación limitada por la ruptura). Alternativamente, la operación puede ser detenida al alcanzarse la caída de presión máxima, sin haberse alcanzado el punto de quiebre (operación limitada por la caída de presión). En cualquiera de los dos casos, el volumen filtrado por unidad de área que se procesa por el filtro es considerado como su capacidad de diseño (Lutz *et al.,* 2009).

La turbidez se define como una medida de la cantidad de luz que se dispersa y absorbe en lugar de ser transmitida en línea recta, cuando un haz de luz incide sobre una muestra. Un método muy utilizado para medir turbidez (EPA, 2003) utiliza como estándard formacina y la caracterización de la muestra se obtiene en unidades de turbidez de formacina FNU (o NTU unidades nefelométricas de turbidez a 90°).

Ejemplo 3.7. Capacidad de diseño de filtro de lecho profundo.

La máxima turbidez aceptable en la clarificación de un caldo de células de mamífero es de 3 FTU. Los datos de filtración del caldo en los filtros A y B son los siguientes:

Filtro A			**Filtro B**		
V (L/m^2)	*FTU*	ΔP (psi)	V (L/m^2)	*FTU*	ΔP (psi)
0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0
1.0	1.0	4.8	1.0	1.00	4.0
3.0	1.2	5.2	3.0	1.20	4.5
4.5	1.4	5.3	5.5	1.30	4.9
7.0	1.6	6.0	7.0	1.40	5.3
8.5	2.2	7.0	9.0	1.45	6.3
11.0	3.3	7.5	10.5	1.50	7.5
12.0	3.9	7.6	12.5	1.60	10.5
14.0	5.5	8.0	14.5	1.80	14.5
16.0	5.9	8.1	17.5	1.90	19.5
18.0	7.8	8.2	19.0	1.95	25.5
22.0	9.0	8.3			

Se pide: Estimar la capacidad de diseño de cada uno de los filtros si la caída de presión de diseño en ambos casos es de 20 *psi*. Los datos de filtración se presentan en la Figura 3.17.

Solución:

a) Puede observarse en la Figura 3.17a que la operación en el filtro **A** está limitada por el rompimiento. De tal manera que la capacidad de diseño del filtro es de aproximadamente de $V = 10.3$ L/m^2.

b) En la Figura 3.17b se muestra que la operación en el filtro **B** está limitada por la caída de presión. La capacidad de diseño del filtro es de aproximadamente de $V = 17.6$ L/m^2.

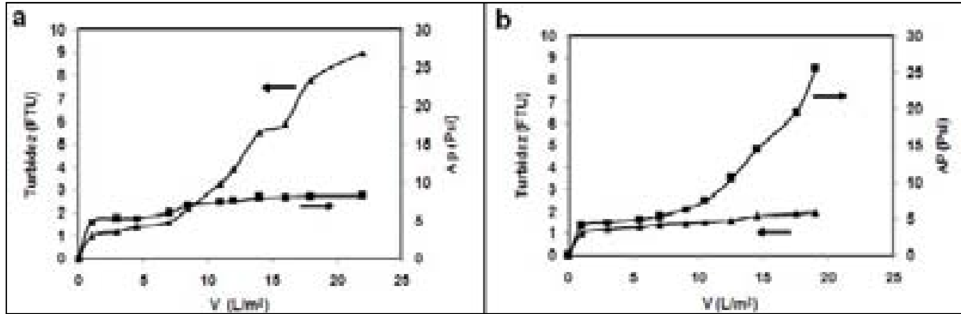


Figura 3.17: Curvas de filtración del Ejemplo 3.7. a) Operación limitada por la ruptura y b) Operación limitada por la caída de presión.

3.4.4. Sistemas Expertos en Filtración

La facilidad actual para almacenar y obtener datos electrónicamente ha estimulado el desarrollo de sistema expertos para la selección de equipos de separación sólido-líquido. Recientemente ha sido reportado (Holdich, 2003) un sitio donde se provee un ejemplo del uso esta metodología.

3.5. Sumario

La filtración es ampliamente utilizada en los procesos biotecnológicos para remover sólidos de líquidos. La teoría básica conjuntamente con algunos experimentos de laboratorio permiten el diseño y operación racional de los procesos de filtración.

Gran parte de los equipos de filtración empleados en bioseparaciones operan mediante la formación de una torta sobre una superficie filtrante por acción de un gradiente de presión. El filtro más empleado en bioseparaciones es el filtro continuo tipo tambor operado mediante vacío, y en menor proporción el filtro por lotes de marcos y placas. Los procedimientos de diseño de filtros que se presentan, consideran la compresibilidad característica de las tortas que forman los materiales biológicos, tanto para la operación por lotes como para la continua.

Los FLP también son importantes en los bioprocesos y son usados para clarificar caldos de cultivo directamente. Frecuentemente también se utilizan conjuntamente con filtros de esterilización.

3.6. Problemas

3.1. Escalamiento de filtración. En la filtración a nivel laboratorio de un caldo para la recuperación de gentamicina, la solución presentó una viscosidad de 1.2 cP y un contenido de sólidos de 5 g/L. El área de filtración empleada fue de 100 cm^2 y el gradiente de presión de 1.8 m de agua. Los datos de filtración son los siguientes:

t (s)	V (L)
10	0.60
20	0.78
30	0.95
40	1.10

Se pide: Estimar el tiempo de filtrado para procesar $5,000$ L de este caldo en un filtro de 1.5 m^2 de área, si el proceso se realiza con un gradiente de presión igual al empleado en el laboratorio.

Resp. 12 h

3.2. Filtración por lotes. Los datos de filtración de *S. griseu* a un pH de 3.8 y a 2 atm de presión, se ajustan a una recta que pasa por los puntos (V/A, At/V) siguientes: $(3, 70)$ y $(6, 180)$, donde (V/A) está en cm y (At/V) en s/cm.

Se pide: Calcular el área de filtración necesaria para procesar 1000 L de este caldo en un tiempo de 15 min bajo las mismas condiciones.

Resp. 18 m^2

3.3. Filtro de placas y marcos. Se efectuaron pruebas de filtración con un filtro prensa de marcos y placas bajo las siguientes condiciones:

$$\begin{aligned} \rho_o &= 10.037 \text{ kg/m}^3 \\ \mu &= 0.001 \text{ N} - \text{s/m}^2 \\ \text{Marcos} &= 430 \times 430 \times 30 \text{ mm} \end{aligned}$$

Los datos obtenidos durante el experimento aparecen en las primeras tres columnas de la tabla siguiente:

Datos			Cálculos	
P $\left(\text{N/m}^2\right)$	t (s)	V $\left(\text{m}^3\right)$	$(V+V_s)/A$ (m)	$(t-t_s)/(V-V_s)$ $\left(\text{s/m}^3\right)$
0.4	447	0.04	0.9	4609.3
0.7	1262	0.10	1.1	4484.4
1.1	1886	0.16	1.2	4757.1
1.3	2552	0.22	1.4	5244.8
1.5	3381	0.28	1.6	5642.5
1.5	3686	0.30		
1.5	4043	0.32	1.7	6604.5
1.5	4793	0.36	1.8	6826.5
1.5	5652	0.40	1.9	7274.2
1.5	6610	0.44	2.0	7727.7
1.5	8680	0.52	2.2	8399.0
1.5	9256	0.54	2.3	8587.1

Se pide: Estimar a) α y b) R_m
Resp. a) $\alpha = 1.069 \times 10^{11}$ m/kg; b) $R_m = 6.61 \times 10^{10}$ m^{-1}

3.4. Filtración con AF. Un caldo de actinomicetos adicionado con 5 % de ayudas-filtro se procesa en un filtro prototipo de 35 cm^2 de área y a una presión de 99, 990 N/m^2, obteniéndose los datos siguientes:

t (s)	$V \times 10^6$ (m^3)
20	9.5
40	16.5
60	22.0
120	35.0
180	45.0
300	61.0
420	74.5

Se pide: Estimar a) $\mu\alpha\rho_o/2\Delta P$, b) $\mu R_m/\Delta P$, c) R_m y d) α'.
Resp. a) 674, 356.5 s/m^2 y b) 5367.71 s/m

3.5. Escalamiento de filtro de marcos y placas. Considerando los datos del Ejemplo 3.3.

Se pide estimar: a) Cuántos marcos se requieren si la dimensión de éstos es de $75 \times 75 \times 3$ cm y b) El tiempo de filtrado si la descarga del filtro se localiza a 3 m de altura.

3.6. Modificación de condiciones de filtración. Se desea filtrar un caldo que contiene cristales de un antibiótico. Las pruebas de filtración en el laboratorio presentan los siguientes datos:

$$\begin{aligned} \text{Área} &= 89 \text{ cm}^2 \\ \Delta P &= 2.6 \text{ m de Hg} \\ \rho_o &= 0.34 \text{ g/100 cm}^3 \end{aligned}$$

t (s)	V (L)
10	0.500
20	0.707
30	0.866

Se pide: Estimar el tiempo de filtración si el volumen que se desea filtrar es de $7,300$ L en un filtro de 1.3 m^2 de área y la solución tiene una $\rho_o = 0.28$ g/cm^3. La presión a esta escala es la misma.

Resp. 23 h

3.7. Resistencia específica variable. Las levaduras forman tortas compresibles (Gerstenberg y Sitting, 1980) cuya resistencia específica ha sido correlacionada con la expresión empírica,

$$\alpha = 1.25 \times 10^{11} (\Delta P)^{0.9}$$

donde α tiene unidades de cm/g y ΔP de atm.

Se pide: Estimar el tiempo necesario para procesar $3,000$ L de un caldo que contiene 30 g/L de la levadura y presenta una viscosidad de 1.2 cP, en un filtro piloto de 5 m^2 de área con una caída de presión de 4 atm.

Resp. 19.6 h

3.8. Índice de compresibilidad. El procesamiento de 30 cm^3 de un caldo de *P. chrysogenum* (de 86 h de cultivo) en un filtro utilizado para medición de biomasa en línea, produjo los siguientes datos:

ΔP (cm de Hg)	Tiempo de filtración
10	271
20	191
30	163
40	138

Se pide: Estimar el índice de compresibilidad de la torta considerando despreciable la resistencia del medio.

Resp. 0.52

3.9. Efecto de las condiciones de operación en filtración continua. Se desea investigar el efecto de las condiciones de operación sobre el flujo en los filtros continuos.

Se pide: Calcular el incremento en flujo de un filtro continuo tipo tambor giratorio al vacío cuando:

a) Se incrementa la velocidad del filtro de 0.3 rpm a 0.5 rpm, manteniéndose el resto de los parámetros constantes.

b) Se incrementa de 30 a 40 % el porcentaje de área sumergida (área sumergida/área total de filtración).

Resp. a) 29 % y b) 15 %.

3.10. Tiempo de filtración. En un proceso de filtración se obtienen 100 g de una torta que forma un lecho de 80 cm^3 con una porosidad de 0.2. El tiempo de filtrado fue de 20 min y el volumen de filtrado colectado en este periodo de 2 L. La resistencia del medio filtrante se considera despreciable y la torta incompresible.

Se pide: Estimar el tiempo para formar una torta de 300 g.

Resp. 180 min.

3.11 Escalamiento de un filtro tipo tambor rotatorio. Un filtro tipo tambor rotatorio opera a 3 rpm y filtra 400 L/min. Se puede considerar la resistencia del medio filtrante despreciable.

Se pide: Calcular a que velocidad debe girar el filtro para procesar 1600 L/min de filtrado, utilizando el mismo vacío y el mismo volumen sumergido del tambor.

Resp. 48 rpm

3.12. Filtración a flujo constante. La mayoría de los procesos de filtración son operados a presión constante, sin embargo hay casos en donde se desea un flux constante. Los siguientes datos se colectaron en un filtro con área de 0.1 ft^2 con una caída de presión constante de 1.0 atm a través del filtro (y torta).

Tiempo	**Vol. filtrado**
(min)	(L)
5	0.40
10	0.55
20	0.76
30	0.93

La viscosidad de filtrado es de 1.1 cP y la alimentación contiene 0.15 kg/L de torta seca.

Se pide: Si se utiliza el mismo filtro y el mismo fluido y si se desea un flujo de filtrado constante de 0.03 L/min, calcular la caída de presión después de colectar 0.8 L del filtrado, suponiendo que la torta es incompresible.

Resp. 1.8 atm. **Pista**. Partir de la ecuación 3.13 para obtener la expresión de flujo constante ($dV/dt = Q$).

3.13. Curvas de la tasa de lavado. Obtener la gráfica de las curvas de la tasa de lavado (Fig 3.16) utilizando la ecuación (3.24).

3.14. Simulación de curvas de lavado. El modelo de dispersión es uno de los modelos más utilizados actualmente para predecir curvas de lavado y está dado por la siguiente expresión (Mareček, 1980):

$$\frac{C}{C_0} = 0.5\left\{1 + \text{erf}\left[\left(\frac{1-n}{2n^{\frac{1}{2}}}\right)(Pe_z)^{\frac{1}{2}}\right]\right\}$$

En esta expresión Pe_z es el número de Peclet en la torta y es función del coeficiente de dispersión axial D_L, estos parámetros están dados respectivamente por:

$$Pe_z = \frac{\upsilon L}{D_L}$$

$$D_L = D_{AB}\left[0.707 + 55.5\,(Pe_p)^{0.96}\right]$$

El número de Peclet referido a la partícula, Pe_p, está dado por:

$$Pe_p = \frac{\upsilon d_p}{D_{AB}}$$

en las expresiones anteriores:

C/C_0 :Concentración adimensional de soluto a la salida de la torta.

erf : Función error.

n : Razón de lavado dada por el volumen de lavado/volumen retenido.

L : Profundidad del lecho

υ : Velocidad intersticial promedio del líquido (flujo sobre área libre de torta; $(Q/\varepsilon_L A)$

ε_L : Porosidad del lecho de la torta.

Q : Flujo de lavado.

A : Área de la sección transversal de la torta.

d_p : Tamaño promedio de las partículas de la torta (volumen/superficie).

En un filtro por lotes a nivel piloto de 0.5 m^2 de área, se realiza una filtración a una presión constante de 5×10^5 N/m^2. La torta es incompresible y la eficiencia de lavado determinada experimentalmente fue de 77 %. La torta se encuentra saturada y se requiere reducir el contenido de soluto en un 95 % utilizado agua como líquido de lavado, para desplazar la solución salina que contiene la torta.

Las constantes características del sistema son:

Propiedad	**Valor**
Difusividad del soluto	$D_{AB} = 1.5 \times 10^{-9}$ m^2/s
Tamaño promedio de partícula	$dp = 5.96 \times 10^{-6}$ m
Resistencia específica de la torta	$\alpha = 1.07 \times 10^{11}$ m/kg
Porosidad de la torta	$\varepsilon_L = 0.24$
Resistencia del medio	$R_m = 6.5 \times 10^{10}$ m^{-1}
Concentración de sólidos secos	$\rho_0 = 105.2$ kg/m^3
Densidad de los sólidos secos	$\rho_s = 2600$ kg/m^3
Densidad del agua	$\rho_{H_20} = 1000$ kg/m^3
Viscosidad del agua	$\mu = 0.001$ N$-$s/m^2
Volumen del líquido en la suspensión filtrada para formar la torta	$V_s = 0.028$ m^3

Se pide:

a) Estimar la razón de lavado n, utilizando la ecuación (3.24).

b) Calcular el flujo de lavado, Q, utilizando la ecuación (3.5) y considerando que en el lavado el flujo se mantiene constante.

c) Estimar la velocidad intersiticial v en el lecho.

d) Estimar la profundidad del lecho, L.

e) Obtener la expresión para la curva de lavado del sistema (C/C_0 vs t) utilizando el modelo de dispersión.

f) Graficar la curva de lavado del sistema.

g) Obtener la expresión de la curva de razón de lavado del sistema (r vs n).

h) Graficar la curva de razón de lavado del sistema.

Resp. a) $n = 2$; b) $Q = 3.60 \times 10^{-4}$ m^3/s; c) $v = 3 \times 10^{-3}$ m/s; d) $L = 2.98 \times 10^{-3}$ m; e) $Pe_z = 9.94$.

f) **Pista:** Utilizar la instrucción de MATLAB:

$$csc0 = 0.5 * (1 + erf(3.15 * (1 - n)./(2 * n.\hat{}0.5)));$$

g) **Pista**: Por balance de masa,

$$r = 1 - \frac{\int_0^n \left(\frac{C}{C_o}\right) dn}{\int_0^\infty \left(\frac{C}{C_o}\right) dn}$$

h) **Pista:** Para obtener una aproximación de las integrales se puede utilizar una instrucción como:

$$int1 = quadl(csc01, 0.000001, n(i));$$

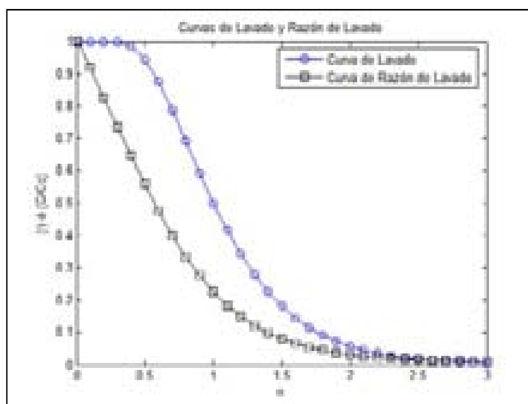


Figura 3.18: Curvas de Lavado y Razón de Lavado del Problema 3.14.

Resp. Las respuestas a los incisos f) y h), se presentan en la Figura 3.18.

3.15. Cambio de condiciones de operación de un filtro tipo tambor. Se requiere aumentar 30 % la capacidad de filtración de un filtro tipo tambor rotatorio por un incremento en la producción de cefalosporina , la cual es producida a partir de un hongo.

Se pide estimar:

a) El incremento de las rpm requeridas, o bien,

b) El incremento del ángulo de formación de la torta.

Resp. a) 69 %

3.16. Uso de AF en un filtro de marcos y placas. Un lodo es filtrado en un filtro prensa de marcos de 2.54 cm. En el procesamiento de un lote, en los primeros 10 *min* la bomba de alimentación trabaja a su máxima capacidad. Durante este periodo la presión se incrementa a 4.0 atm y se obtiene el 25 % del filtrado total. El resto de la filtración se realiza en 1.0 h y el tiempo de servicio del filtro es de 15 min.

Se ha encontrado que si se utilizan ayudas-filtro en capas de 0.16 cm de espesor, la resistencia de la torta se reduce en un 75 %.

Se pide: Calcular el incremento en la producción de filtrado (L/min) si aplicar la ayuda filtro toma 3 min.

Pista: $V_f = (8\ R_m A) / (\alpha \rho_o)$

Resp. 8 %

3.7. Bibliografía

Aiba, S.; Humphrey, A.E.; Mills, N.F. **1972**. *Biochemical Engineering.* Academic Press. New York. 355-356.

Anderson, S.W.; Collins, M.; Muehl, M. **2009**. Expanding Disposable Depth-Filter Applications. *GEN.* 29, 1-4.

Brown, T.R. **1982**. Designing batch pressure filters. *Chem. Eng.* 89, 58-63.

Choudhury, A.P.R.; Dahlstrom, D.A. **1957**. Prediction of cake-washing results with continuous filtration equipment. *AICHE, J.* 3, 433-438.

Cushing, R.; Lawler, D. **1998**. Depth Filtration: Fundamental Investigation through Three-Dimensional Trajectory Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3793-3801.

EPA. **2003**. Analytical Method for Turbidity Measurement Method 180.1

Gerstenberg, H.; Sitting, W. **1980**. Recovery of fermentation products. *Chem. Eng. Technol.* 52, 19-31.

Holdich, R.G. **2003**. Solid–liquid separation equipment selection and modelling. *Minerals Engineering* 16, 75–83.

Jornitz, M.W.; Meltzer, T.H. **2008**. *Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry.* Vol 174. 2da Ed. Informa Healthare. New york. NY.

Lutz, H.; Blanchard, M.; Abbott, I.; Parampalli, A.; Setiabudi, G.; Chiruvolu, V.; Noguchi, M. **2009**. Considerations for scaling-up depth filtration of harvested cell culture fluid. *Biopharm.* 22, 58-63.

Mareček, N. **1980**. Optimizing of performance of the leaf filters. *Filtr. Separation.* 17,34-50.

Martin, R.E.; Bouwer, E.J.; Hanna, L.M. **1992**. Application of clean-bed filtration theory to bacterial deposition in porous media. *Envlron. Scl. Technol.* 26, 1053-1058.

Moir, D.N. **1982**. Selecting batch pressure filters. *Chem. Eng.* 89, 47-57.

Olivier. J.; Vaxelaire, J.; Vorobiev, E. **2007**. Modelling of Cake Filtration: An overview. *Sep. Sci. Tech.*, 42, 1667–1700.

Petrides, D.P.; Cooney, C.L.; Evans, L.B. **1989**. An intoducction to biochemical process design. En: *Chemical Engineering Problems in Biotechnology.* Shuler, M.L. (Ed.). AIChE. New York. 351-391.

Rajniak, P.; Tsinontides, S.C.; Pham, D.; Hunke, W.A.; Reynolds, S.D.; Chern, R.T. **2008**. Sterilizing filtration—Principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *J. Memb. Sc.* 325, 223–237.

Rees, R.H.; Cain, C.W. **1990**. Let Diatomite Enhance Your Filtration. *Chem. Eng.* 97, 76-79.

Roush, D.J.; Lu, Y. **2008**. Advances in primary recovery: Centrifugation and membrane technology. *Biotechnol. Prog.* 24, 488-495.

Svarovsky, L. **2000**. Solid-liquid separations. Butterworth Heinemann. 4th Edition. Woburn Ma.

Tiller, F.M. **1974**. Bench-Scale design of SLS systems. *Chem. Eng.* 81, 117-119.

van Reis, R.; Zydne, A. **2007**. Bioprocess membrane technology. *J. Memb. Sc.* 297, 16–50.

Capítulo 4

Centrifugación

4.1. Introducción

La separación de substancias de diferente densidad mediante movimiento giratorio se conoce como centrifugación.

La centrifugación es una de las principales operaciones utilizada para la separación de células de caldos biológicos (Roush y Lu, 2008; Wiesmann y Bider, 1982), especialmente cuando los caldos no son fácilmente filtrables, o la adición de ayudas-filtro no es recomendable por razones de costos o de producción excesiva de desechos contaminantes.

La centrifugación también es empleada en la remoción de desechos celulares de caldos de células que han sido sujetas a rompimiento, en la separación de precipitados proteicos (Bell *et al.,* 1983) y para la recuperación de productos insolubles como los cuerpos de inclusión. Estos últimos debido a su tamaño ($0.3 - 1$ μm) y alta densidad ($1.3 - 1.5$ g/cm^3) pueden ser separados de los restos celulares por centrifugación en dos o tres pasos, utilizando agua de lavado y detergentes para facilitar la separación.

Cuando se utiliza la centrifugación, la diferencia entre la densidad de los sólidos (células o partículas) y el caldo, se incrementa por la acción de las fuerzas centrífugas que se generan por las altas velocidades de rotación de los equipos que se emplean (Bjurstrom, 1985).

En la sección 4.2 de este capítulo se presentan los fundamentos de la centrifugación que se derivan de la Ley de Stokes, la cual describe los aspectos básicos del movimiento de un sólido en un líquido cuando existe un gradiente de densidad.

Existen diferentes tipos de centrífugas que se utilizan tanto a nivel laboratorio como a escala industrial y su aplicación depende de varios factores análogos a los mencionados para la filtración en la Tabla 3.1. En la sección 4.3 se hace una descripción general de estos equipos. La sección 4.4 se centra en los aspectos básicos del diseño y selección de centrífugas.

4.2. Fundamentos de la Centrifugación

El estudio de las separaciones sólido-líquido por centrifugación está basado en la teoría de la sedimentación. Ésta permite desarrollar algunas predicciones del comportamiento de los equipos centrífugos, no sólo para poder especificarlos y dimensionarlos, sino que también ofrece un apoyo adecuado para su correcta operación.

La teoría de la sedimentación está basada en la Ley de Stokes que establece los aspectos básicos del movimiento de un sólido en un líquido cuando existe un gradiente de densidad. Este movimiento puede ser causado por la fuerza gravitacional o por una fuerza centrífuga. Con base a lo anterior, esta sección se centra en cuatro aspectos fundamentales:

- La Ley de Stokes.
- La sedimentación por acción de la gravedad.
- La sedimentación por acción de una fuerza centrífuga.
- El factor G.

4.2.1. Ley de Stokes

La velocidad de sedimentación de una partícula esférica en un medio continuo para Reynolds menores a 1 (región de resistencia viscosa), está descrita por la Ley de Stokes (Fig. 4.1). Se puede suponer que esta ley es aplicable para las suspensiones diluidas características de los caldos biológicos .

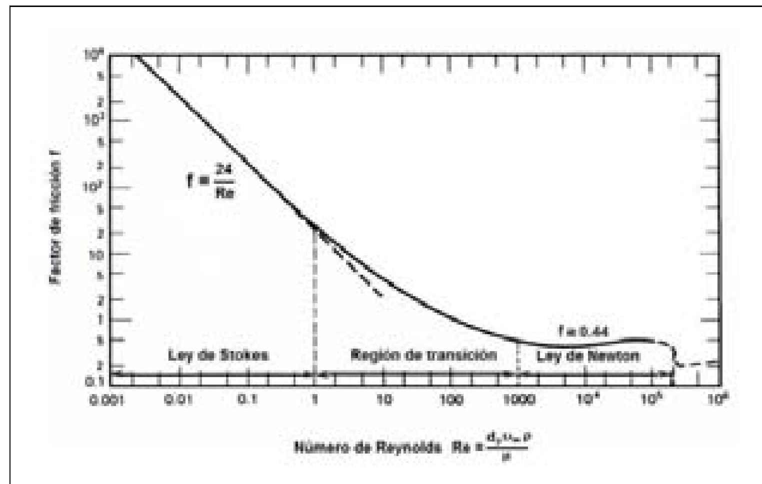


Figura 4.1: Factor de fricción para esferas. Fuente: Bird *et al.*, 1964.

La Ley de Stokes establece que cuando se aplica una fuerza a una partícula en un medio continuo ésta se acelera ($F = ma$), hasta que alcanza una velocidad a la cual la resistencia a su movimiento iguala a la fuerza aplicada ($m_p \, dv/dt = 0$). En una sedimentación libre la fuerza que actúa sobre la partícula es la de la gravedad, mientras que en una sedimentación centrífuga la fuerza es la del campo centrífugo.

Las fuerzas que se oponen al movimiento de las partículas pueden agruparse en la fuerza de flotación descrita por el principio de Arquímides y la fuerza de arrastre (resistencia de forma y de fricción) descrita por la Ley de Stokes. De acuerdo a lo anterior, el balance de fuerzas para una partícula en equilibrio en un medio continuo se expresa de la siguiente manera (Fig. 4.2):

Fuerza de aceleración (F_{ac}) = Fuerza de flotación (F_f)+Fuerza de arrastre (F_a)

Para el caso de partículas esféricas el balance anterior puede expresarse como:

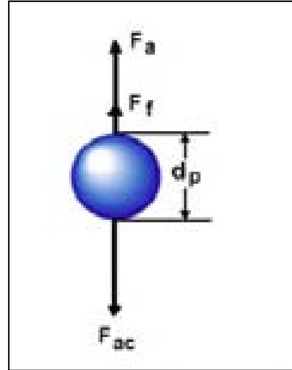


Figura 4.2: Balance de fuerzas en una partícula esférica en equilibrio en un medio continuo.

$$\frac{\pi d_p^3 \rho_p a}{6} = \frac{\pi d_p^3 \rho_L a}{6} + 3\pi d_p \mu v_\infty \qquad (4.1)$$

donde:

d_p: Diámetro de la partícula.$[L]$.

ρ_p: Densidad de la partícula.$[M/L^3]$.

a: Aceleración. $[L/t^2]$.

ρ_L: Densidad del líquido. $[M/L^3]$.

μ: Viscosidad del fluido. $[M/L - t]$.

υ_∞: Velocidad terminal de la esfera. $[L/t]$.

Es importante hacer notar que si en el proceso de sedimentación la partícula parte del reposo, conforme la velocidad de la partícula se incrementa la fuerza de arrastre se incrementa. Al alcanzar el equilibrio de fuerzas la partícula se mueve a la velocidad constante υ_∞ (velocidad terminal).

La ecuación (4.1) puede ser modificada para presentarse como una expresión de la Ley de Stokes, de la siguiente manera:

$$3\pi d_p \mu \upsilon_\infty = \frac{\pi d_p^3 a}{6}\left(\rho_p - \rho_L\right) \tag{4.2}$$

La velocidad de sedimentación de una partícula de acuerdo a la ecuación (4.2) es la siguiente:

$$\upsilon_\infty = \frac{d_p^2 \Delta\rho a}{18\mu} \tag{4.3}$$

donde: $\Delta\rho = \rho_p - \rho_L$

La Ley de Stokes implica que un proceso de sedimentación puede ser mejorado incrementando el tamaño de partícula o la diferencia de densidades, reduciendo la viscosidad del medio o incrementando la aceleración de las partículas. Esta Ley ha sido desarrollada para partículas esféricas, que se mueven uniformemente en fluidos newtonianos y que no se obstruyen entre sí.

Se puede expresar la velocidad de sedimentación de una partícula, en dos casos límites de interés: a) sedimentación por acción de la gravedad y b) sedimentación por acción de una fuerza centrífuga.

4.2.2. Sedimentación por Acción de la Gravedad

En varios procesos de separación sólido-líquido la fuerza impulsora de la sedimentación es sólo la de la gravedad. La velocidad de sedimentación por gravedad de una sustancia, proporciona información básica necesaria para el diseño de cualquiera de los procesos de sedimentación.

De acuerdo con la Ley de Stokes si la aceleración de la sedimentación es sólo la de la gravedad, la expresión de la velocidad de sedimentación de acuerdo con la ecuación (4.3) es:

$$\upsilon_g = \frac{d_p^2 \Delta\rho g}{18\mu} \tag{4.4}$$

donde:

$a = g$: Aceleración de la gravedad. $[L/t^2]$.

υ_g: Velocidad terminal en un campo gravitacional. $[L/t]$.

Ejemplo 4.1. Velocidad y posición de una partícula durante su sedimentación.

Una partícula de 1.0 μm de diámetro y densidad de 1.06 g/cm^3, se sedimenta en agua cuya densidad es de 1.00 g/cm^3 y su viscosidad de 0.01 g/cm−s.

Se pide: Graficar la velocidad y posición de la partícula con el tiempo.

Solución:

El balance de fuerzas sobre la partícula está dado por:

$$\left(\frac{\pi d_p^3 \rho_p}{6}\right)\frac{dv}{dt} = \frac{\pi d_p^3 \rho_p g}{6} - \frac{\pi d_p^3 \rho_L g}{6} - 3\pi d_p \mu v$$

Esta ecuación puede ser integrada para obtener:

$$v = (v_\infty)\left[1 - \exp\left(-\frac{18\mu t}{d_p^2 \rho_p}\right)\right]$$

La integración de la expresión de la velocidad permite obtener la ecuación de la variación de la posición de la partícula con el tiempo.

En la Figura 4.3 se presenta el programa MATLAB que se utilizó para obtener la Figura 4.4.

4.2.3. Sedimentación Centrífuga

En las separaciones sólido-líquido mediante centrífugas la velocidad de sedimentación es mayor que la sedimentación libre o gravitacional, debido a que los equipos al girar producen una mayor aceleración de las partículas (Brunner y Hemfort, 1988). Bajo estas condiciones la velocidad de sedimentación derivada de la ecuación (4.3) es:

$$v_\omega = \frac{d_p^2 \Delta\rho \omega^2 r}{18\mu} \tag{4.5}$$

donde:

$a = \omega^2 r$: Aceleración centrífuga. $[L/t^2]$.

ω: Velocidad de rotación en radianes. $[t^{-1}]$.

r: Distancia radial del eje de rotación a la partícula. $[L]$.

Varias aplicaciones importantes pueden obtenerse de los principios inherentes a las ecuaciones (4.4) y (4.5), a continuación se presentan algunas de ellas:

a) El diámetro aparente de las bacterias es del orden de diez veces menor que el de las levaduras, por lo que su velocidad de sedimentación es cien veces menor, ya que ésta es proporcional al cuadrado del diámetro de la partícula.

b) Las células contienen más del 70 % de agua por lo que su densidad es muy semejante a la de los caldos, por lo tanto el parámetro $\Delta\rho$ puede ser muy bajo.

c) Algunos caldos biológicos son muy viscosos, propiedad que dificulta la sedimentación.

```
%==========================================================================
% Bioseparaciones 2da Edicion
% Ejemplo_4.1
% Nombre del archivo ejemplo_4_1
clear
clc
clf
%--------------------------------------------------------------------------

%--------------------------------------------------------------------------
%                          Entrada de datos
%==========================================================================
dp=1e-4; % cm
rop=1.06; % g/cm3
rol=1.00; % g/cm3
mu=0.01; %g/cm-s
g=980; % cm/s2
tfin=1e-4;% s
%--------------------------------------------------------------------------
%                   Cálculo de la velocidad terminal
%--------------------------------------------------------------------------
vtes=dp^2*(rop-rol)*g/(18*mu);
%--------------------------------------------------------------------------
%                   Cálculo de la velocidad de la particula
%--------------------------------------------------------------------------
t=[0:1e-6:tfin];
l=length(t);
v=vtes*(1-exp(-18*mu*t/(dp^2*rop)));
%--------------------------------------------------------------------------
%                   Cálculo de la distancia recorrida
%--------------------------------------------------------------------------
for i=1:l
vi=@(t)vtes*(1-exp(-18*mu*t./(dp^2*rop)));
x(i)=quad(vi,0,t(i));
end
%--------------------------------------------------------------------------
%                      Gráfico de resultados
%--------------------------------------------------------------------------
plotyy(t,v,t,x)
[hejes,hline1,hline2] = plotyy(t,v,t,x);
axes(hejes(1))
ylabel('v(cm/s)')
axes(hejes(2))
ylabel('x (cm)')
xlabel('t (s)')
set(hline1,'color','k')
set(hline2,'color','k')
set(hline1,'LineStyle','-')
set(hline2,'LineStyle','--')
%--------------------------------------------------------------------------
%                         Fin del programa
%==========================================================================
```

Figura 4.3: Programa MATLAB para la solución del Ejemplo 4.1.

d) La velocidad de sedimentación puede ser incrementada en un equipo centrífugo aumentando la velocidad de rotación o la distancia de sedimentación (diámetro de la centrífuga).

Para obtener una expresión para describir la sedimentación en flujo no laminar la ecuación (4.2) puede ser expresada como:

$$\begin{aligned}
\frac{\pi d_p^3 a \Delta\rho}{6} &= \left(\frac{\pi d_p^2}{4}\right)\left(\frac{1}{2}\rho_L \upsilon_\infty^2\right)\left(\frac{24}{\frac{d_p \upsilon_\infty \rho_L}{\mu}}\right) \\
\frac{\pi d_p^3 a \Delta\rho}{6} &= AKf \\
f &= \frac{\pi d_p^3 a \Delta\rho}{6AK}
\end{aligned}$$

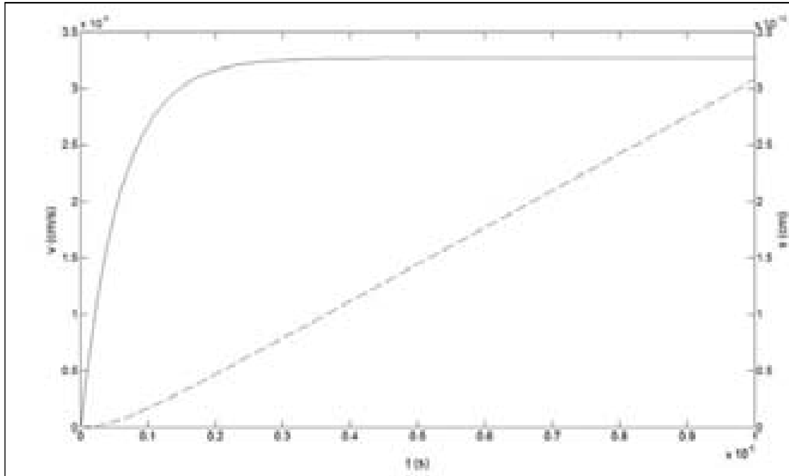


Figura 4.4: Solución del Ejemplo 4.1. Gráfica de la velocidad y la distancia de una partícula a diferentes tiempos.

donde:

A: Área característica. $[L^2]$.

K: Energía por unidad de volumen. $[M/Lt^2]$.

f: Factor de fricción. [adimensional.]

Particularmente, para flujo reptante alrededor de una esfera (Bird *et al.*, 2002),

$$f = \frac{24}{\text{Re}} \qquad \text{Re} < 0.1$$

Para valores mayores del número de Reynolds se tiene:

$$f = \left(\sqrt{\frac{24}{\text{Re}}} + 0.5407 \right)^2 \qquad \text{Re} < 6000$$

$$f = 0.44 \qquad 5 \times 10^2 < \text{Re} < 10^5$$

Ejemplo 4.2. Separación centrífuga diferencial.
El principio de separación por centrifugación diferencial se basa en las diferentes velocidades de sedimentación de las partículas. En el caso de homogeneizados biológicos, las diferentes partículas celulares suelen ser separadas por centrifugación diferencial.

Se pide: Estimar el tiempo de sedimentación relativo de una partícula celular de diámetro 5 μm (núcleo) con respecto al de una de diámetro de 1 μm (mitocondria), suponiendo que ambas tienen la misma densidad y están sujetas al mismo campo centrífugo en una centrífuga de tubos (Fig. 4.5) los cuales giran perpendicularmente al eje.

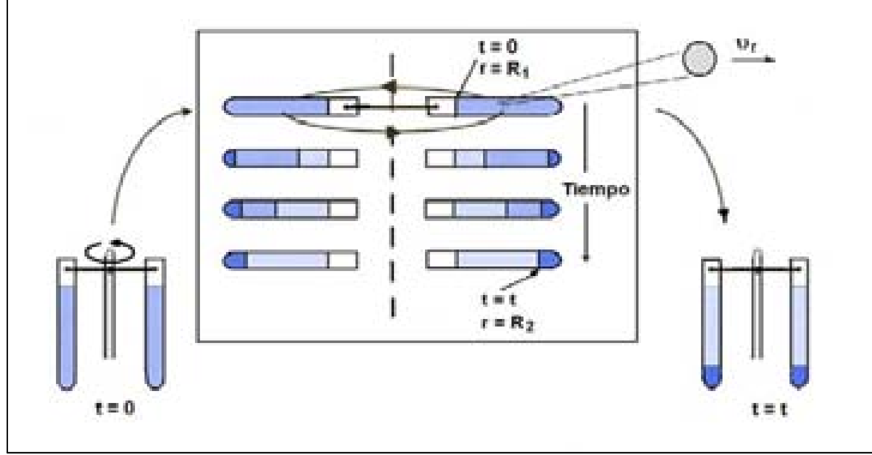


Figura 4.5: Centrifugación diferencial. Adaptada de: Bailey y Ollis, 1986. Reproducida con el permiso de Mc Graw Hill Inc. Copyright ©1986. Todos los derechos reservados.

Solución:

De acuerdo a la ecuación (4.5) y a la geometría del sistema, la velocidad de sedimentación está dada por:

$$v_r = \frac{dr}{dt} = \frac{d_p^2 \Delta\rho\omega^2 r}{18\mu}$$

La expresión anterior puede ser utilizada para el cálculo del tiempo de sedimentación integrando entre los límites:

$$t = 0 \qquad r = R_1$$

$$t = t \qquad r = R_2$$

una vez realizada la integración se obtiene la expresión siguiente:

$$t = \frac{18\mu}{d_p^2 \Delta\rho\omega^2} \ln\left(\frac{R_2}{R_1}\right)$$

Aplicando la expresión anterior a cada partícula, (al núcleo N y a la mitocondia M) se pueden obtener las siguientes proporciones:

$$\begin{aligned}
\frac{t_N}{t_M} &= \frac{(d_p^2)_M}{(d_p^2)_N} \\
t_N &= (t_M)\frac{(1\ \mu\text{m})^2}{(5\ \mu\text{m})^2} = \frac{t_M}{25}
\end{aligned}$$

donde t_N es el tiempo que tarda la partícula N en avanzar de R_1 a R_2. Análogamente, t_M es el tiempo que tarda la partícula M en avanzar de R_1 a R_2.

Ejemplo 4.3. Tiempo de sedimentación.

La centrífuga del ejemplo anterior va a ser utilizada para separar levaduras con diámetro de Stokes de 10 μm y densidad de 1.05 g/cm^3. Las propiedades del caldo se pueden suponer iguales a las del agua. La distancia del eje de giro a la superficie del líquido en los tubos es $R_1 = 3$ cm y a la base del tubo es de 10 cm. La centrífuga gira a 400 rpm.

Se pide: Estimar el tiempo para lograr una sedimentación completa de las levaduras de la suspensión.

Solución:

Se debe estimar el tiempo que tardan en sedimentar las levaduras que estén más apartadas del fondo del tubo, es decir en la superficie del líquido del tubo. Aplicando la expresión desarrollada en el ejemplo anterior se tiene:

$$\begin{aligned}
t &= \frac{18\mu}{d_p^2 \Delta\rho\omega^2}\ln\left(\frac{R_2}{R_1}\right) \\
t &= \frac{18 \times 0.01\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}-\text{s}} \times \ln\left(\dfrac{10}{3}\right)}{(10 \times 10^{-4})^2\ \text{cm}^2 \times (1.05-1)\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times \left(\dfrac{400 \times 2\pi}{60}\right)^2\ s^{-2}} \\
t &= 2,471\ \text{s}
\end{aligned}$$

4.2.4. Factor G

En la caracterización y escalamiento de centrífugas frecuentemente se emplea el factor G, que es una medida relativa de la velocidad de sedimentación de una partícula en un campo centrífugo con respecto a su velocidad de sedimentación en el campo gravitacional. De acuerdo a lo anterior mediante las ecuaciones (4.4) y (4.5) se obtiene:

$$G = \frac{v_\omega}{v_g} = \frac{\omega^2 r}{g} \tag{4.6}$$

G puede ser referida a un radio característico el cual generalmente es el radio exterior del campo centrífugo. Esto permite desarrollar expresiones prácticas para estimar la G como la siguiente:

$$G = 5.6 \times 10^{-7} N^2 D$$

donde N está en rpm, el diámetro del tazón de la centrífuga (o punto de interés) D en mm y G es adimensional.

4.3. Equipo de Centrifugación

La sedimentación centrífuga y la filtración constituyen los principios básicos de operación de los principales equipos de centrifugación que se emplean para separar ya sea dos líquidos o los sólidos de una suspensión (Svarovsky, 2000). La principal clasificación de los equipos de centrifugación se basa en el diseño de su tazón o tina, y en la forma como se descargan de los sólidos sedimentados.

En esta sección se presentan los principales equipos de centrifugación existentes de acuerdo a su clasificación, en dos grupos:

- Equipos de Sedimentación Centrífuga: Centrífugas tubulares, de cámara múltiple, de tazón sólido, decantadoras y de discos.
- Equipos de Centrifugación-Filtración.

4.3.1. Equipos de Sedimentación Centrífuga

En los equipos de sedimentación centrífuga también llamados de tazón sólido o canasta no perforada (para distinguirlos de los de canasta perforada), la suspensión se alimenta a un tazón que se hace girar provocando que los sólidos se colecten sobre una pared y el sobrenadante se recupere por rebosamiento o por acción de un colector de líquido.

En relación a la forma de descargar los sólidos, las centrífugas sedimentadoras pueden operar en forma intermitente, semintermitente o continua.

Las centrífugas sedimentadoras se utilizan en operaciones de separación sólido-líquido, tanto para remoción de biomasa (clarificación) como para recuperar sólidos durante la cosecha celular.

En las operaciones de clarificación el caldo a procesar generalmente contiene una baja cantidad de sólidos, del orden del 1 %. El objetivo es producir un líquido claro de tal manera que en las operaciones de separación posteriores, la interferencia por sólidos sea mínima. En las operaciones de recuperación de sólidos las corrientes de salida pueden contener hasta un 40 % de sólidos en volumen.

A continuación se efectúa una breve descripción de los principales tipos de centrífugas sedimentadoras utilizadas en las bioseparaciones.

Centrífuga tubular

Las Centrífugas Tubulares (CT) consisten básicamente de un tubo vertical esbelto que gira a altas velocidades por la acción de un motor eléctrico, o una turbina de aire o vapor (Fig. 4.6a).

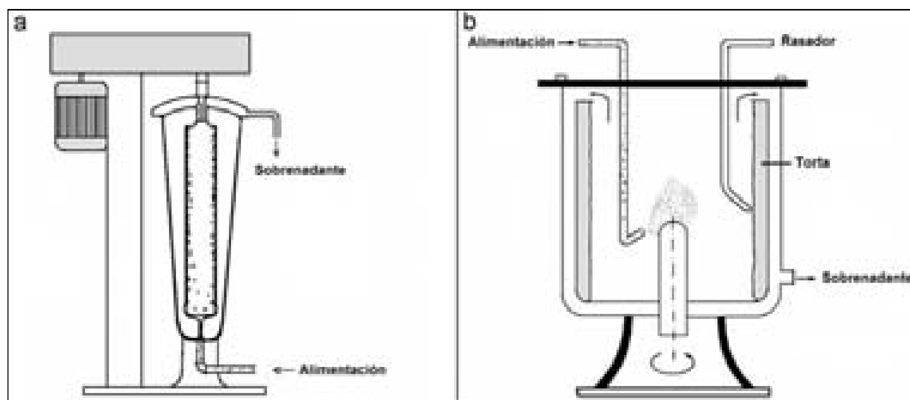


Figura 4.6: Centífugas sedimentadoras. a) Tubular y b) De tazón sólido.

Este tipo de centrífuga es uno de los más eficientes y sencillos, capaz de separar partículas hasta de 0.1 μm. Las CT pueden contar con un sistema de enfriamiento por lo que son empleadas en el manejo de caldos con enzimas o proteínas.

Como se observa en la Figura 4.6a, durante una operación típica de la CT la suspensión es alimentada por la parte inferior y los sólidos sedimentan en la pared del tubo. El líquido claro se colecta por rebosamiento en la parte superior. Conforme se forma la torta, el área de flujo se reduce y el tiempo de residencia del líquido disminuye. Esto se traduce en un aumento gradual del contenido de sólidos en el sobrenadante que puede ser determinado por mediciones de turbidez. La torta tiene que ser descargada manualmente, por lo que su operación es por lotes.

Un modelo típico de laboratorio consta de un tubo de 4.5 cm de diámetro por 25 cm de longitud, el cual puede girar a una velocidad de hasta $50,000$ rpm, desarrollando campos hasta de $62,000$ G, con una capacidad de hasta 100 L/h.

Los modelos industriales típicos cuentan con un tubo de 11.5 cm de diámetro por 76 cm de longitud, el cual puede girar hasta con $15,000$ rpm desarrollando campos de hasta de $12,000$ G, con capacidad entre 500 y $3,500$ L/h. La capacidad de sólidos es de 2 a 4 kg por lote.

Este tipo de centrífugas presentan algunos modelos completamente sellados para minimizar problemas de formación de espuma y aerosoles, lo cual puede ocasionar fugas del sistema y debe ser evitado cuando se trabaja con sustancias tóxicas o células recombinantes.

Centrífugas de tazón sólido

Las centrífugas de tazón sólido (Fig. 4.6b) o centrífugas por lotes son muy similares a las centrífugas tubulares pero menos esbeltas; su relación de longitud a diámetro es de alrededor de 0.6, mientras que el de las tubulares es de $4 - 8$.

Las centrífugas de tazón sólido normalmente son operadas con su eje en posición vertical. La alimentación de la suspensión se efectúa en el fondo del tazón, el cual al girar permite que los sólidos se depositen sobre la superficie de la pared del tazón y el sobrenadante se obtenga en forma continua por rebosamiento en la parte superior. En algunos modelos el ciclo se controla por medio de un detector del espesor de la torta. El líquido residual sobre la torta puede ser removido utilizando un tubo rasador móvil.

La forma de descarga de los sólidos depende de su naturaleza. Los sólidos muy fluidos pueden descargarse sin parar la centrífuga y los sólidos muy compactos pueden descargarse utilizando una cuchilla interior de la centrífuga que permite raspar la pared del tazón para desprender la torta. Ambos tipos de descarga se realizan a través de la parte inferior de la centrífuga. Un tipo especial de centrífuga por lotes es la de tazón triple (Fig. 4.7).

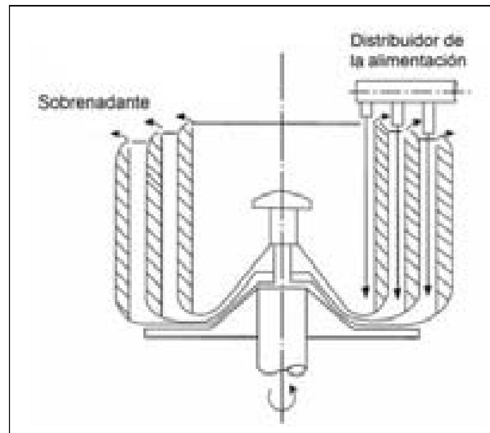


Figura 4.7: Centríugas de tazón triple. Fuente: Svarousky, 1979. Reproducida con el permiso de McGraw-Hill Inc. Copyright ©1979. Todos los derechos reservados.

Las centrífugas por lotes en su versión de laboratorio presentan tazones de 15 cm de diámetro y las de planta piloto entre $23 - 53$ cm, con capacidades volumétricas de 2.7 a 27.0 L. Las industriales tienen tazones entre $95 - 125$ cm con capacidades volumétricas de 100 a 300 L.

Centrífugas de cámara múltiple

Las centrífugas de cámara múltiple (Fig. 4.8) fueron creadas para incrementar la capacidad de manejo de sólidos de las centrífugas tubulares. Estas centrífugas consisten de una serie de tazones concéntricos con deflectores que provocan un flujo en serie de la suspensión. Su operación permite la clasificación de las partículas conforme pasan de una cámara a otra. El líquido claro se obtiene por rebosamiento en la última cámara. Este arreglo permite un mayor

tiempo de residencia del líquido y una mayor capacidad de manejo de sólidos, que la centrífuga tubular.

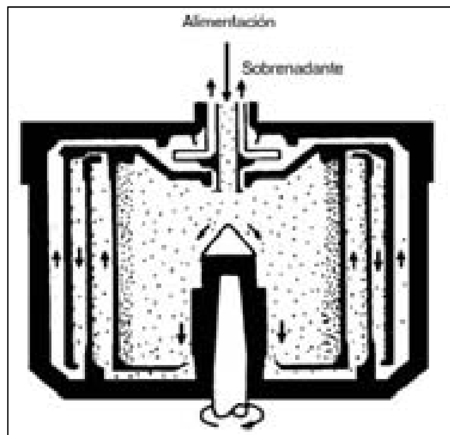


Figura 4.8: Centrífuga de cámara múltiple. Fuente: Axelsson, 1985. Reproducida con el permiso de Elsevier Science Inc. Copyright ©1985. Todos los derechos reservados.

El diámetro de los equipos de cámara múltiple varía de 335 a 615 mm, con velocidades de rotación entre 5, 000 y 8, 400 rpm, produciendo campos entre 5, 000 y 9, 000 G, respectivamente. Los tipos más comunes constan de 2 a 6 cámaras. La capacidad de manejo de sólidos varía entre 2.5 y 60.0 L dependiendo del material y el número de cámaras. La descarga de sólidos y mantenimiento de estos equipos es más difícil que el de las centrífugas tubulares, ya que la centrífuga tiene que ser desmantelada para sacar los sólidos. Este tipo de equipo no permite el lavado de la torta.

Centrífugas decantadoras o de tornillo

Las centrífugas decantadoras (Fig. 4.9) se caracterizan por un tazón horizontal con una sección cilíndrica y una sección cónica, con una relación de longitud a diámetro entre $1.5 - 3.5$. El tazón contiene un tornillo transportador que gira en la misma dirección, pero a una velocidad ligeramente superior o inferior que el tazón (entre 5 - 100 rpm de diferencia). Las velocidades de rotación son de 1, 600 a 6, 000 rpm por lo que los campos centrífugos son bajos.

En las centrífugas decantadoras la suspensión es introducida a través de perforaciones por un tubo axial concéntrico a la flecha del tornillo, al final de la sección cónica o de compresión de sólidos. Los sólidos que se depositan en la pared son transportados y descargados continuamente por el extremo cónico de la centrífuga, donde escurren antes de salir. El líquido claro se obtiene por rebosamiento en el extremo opuesto a través de orificios de descarga que fijan el nivel del líquido en la centrífuga.

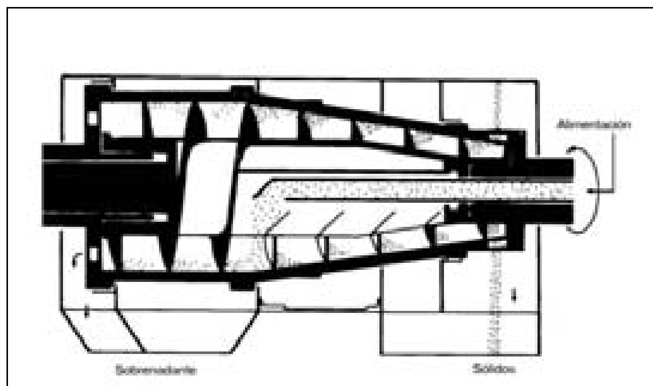


Figura 4.9: Centrífuga decantadora. Fuente: Axelsson, 1985.

Existen diversos diseños de centrífugas decantadoras. Los diámetros de los tazones varían de 15 a 140 cm para los modelos piloto e industriales. La descarga de sólidos varía de 30 kg/h hasta 60 ton/h, con alimentaciones entre 3.8 y 1890.0 L/min, respectivamente. La longitud de la sección cilíndrica y la sección cónica pueden variar de acuerdo a las aplicaciones. Entre más larga sea la sección cilíndrica mayor es la clarificación alcanzada. Por otro lado, el aumento de longitud en la sección cónica permite la obtención de tortas con menor contenido de agua.

Entre mayor sea el nivel de líquido dentro de la centrífuga se obtendrá una mejor clarificación, pero un menor escurrimiento de la torta en la sección cónica. La disminución de la velocidad de rotación del tornillo transportador aumenta la capacidad de desagüe de la torta pero disminuye la capacidad de manejo de sólidos.

La centrífuga de tornillo es una de las más utilizadas en bioseparaciones principalmente para manejo de grandes cantidades de sólidos como es el caso del tratamiento de aguas residuales (Amirante y Catalano, 2000).

Centrífuga de discos

La centrífuga de discos consta de un eje vertical sobre el cual se monta un conjunto de discos en forma de conos truncados, uno sobre otro. El rotor de la centrífuga provoca el giro tanto de los discos como del tazón de la centrífuga (Fig. 4.10).

Las centrífugas de discos son las más utilizadas en BSL. Los discos constan de bordos internos que permiten mantener pequeñas separaciones entre ellos, del orden de 0.5 a 2.0 mm. El ángulo que forman los conos con la vertical varía entre 35 y 50° dependiendo de la aplicación particular. Entre la pila de discos y el tazón existe un espacio que permite la acumulación de los sólidos.

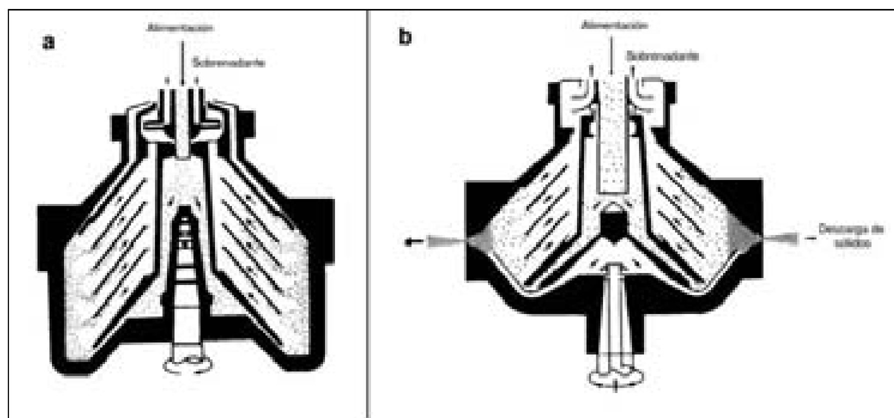


Figura 4.10: Centrífugas de discos. a) Retención de sólidos. b) Tazón abierto. Fuente: Jacobs y Penney, 1987.

Durante la operación de la centrífuga de discos, la suspensión es alimentada continuamente en el fondo del tazón a través de la parte central de la flecha, y fluye hacia arriba entre las placas hacia la salida en la parte central superior del equipo. Debido a la fuerza centrífuga los sólidos se depositan en la cara interna de los discos, resbalando hacia la cámara colectora debido al ángulo de los discos.

En relación a la forma de descarga de sólidos los principales tipos de centrífugas de discos son de: a) operación por lotes con respecto a la descarga de sólidos, también llamadas de retención de sólidos, b) tazón abierto de descarga intermitente de sólidos, c) válvula tipo boquilla de descarga intermitente de sólidos y d) boquilla para la descarga continua de sólidos.

En las centrífugas de retención de sólidos (Fig. 4.10a) éstos se acumulan hasta que la cámara se llena. La centrífuga tiene que ser detenida y descargada manualmente o con auxilio de un forro que se coloca previamente sobre la pared del tazón. Debido a la forma de su descarga de sólidos, este tipo de centrífuga es recomendable sólo para suspensiones diluidas conteniendo alrededor de 1 % en volumen de sólidos.

El diámetro de los tazones de las centrífugas de retención de sólidos varía de 24 a 44 cm y las fuerzas centrífugas de $5,000$ a $8,000$ G. La capacidad de sólidos varía de $5 - 20$ L y los flujos de 0.4 a $1,500$ L/min.

Las centrífugas de disco de tazón abierto (Fig. 4.10b) constan de dos piezas cónicas unidas horizontalmente por sus caras más grandes. La descarga de sólidos se realiza por medio de un sistema hidráulico que permite abrir y cerrar los orificios de descarga entre las piezas. La duración y frecuencia de la apertura de la descarga depende de la cantidad y fluidez de los sólidos. Los valores típicos son de 0.13 a 0.30 s de apertura por minuto de operación. Esta frecuencia es

controlada con relojes acoplados a medidores de lodo o medidores de turbidez en el líquido de salida. Este tipo de centrífugas permite manejar caldos con contenido de sólidos hasta del 10 %. Las fuerzas centrífugas varían de 5,000 a 7,000 G y los gastos de 3.8 a 1,500 L/min.

En las centrífugas con válvulas tipo boquilla la descarga de sólidos se controla con este tipo de válvulas situadas en la periferia del tazón. Sus ciclos varían de 0.07 a 0.10 s de apertura por minuto de operación. Tal precisión no puede ser lograda por las centrífugas de tazón abierto. La ventaja de este tipo de centrífugas, debido a que generan campos de hasta 15,000 G, es que son especialmente útiles para caldos biológicos donde el diferencial de densidad suele ser bajo y la viscosidad alta. Las suspensiones que pueden ser manejadas, alcanzan hasta un 10 % en volumen de sólidos.

En las centrífugas de boquillas con descarga continua éstas se sitúan en la periferia del tazón. El número y el tamaño de las boquillas se ajusta de tal manera que exista un flujo continuo de sólidos, sin que éstos se acumulen. El espaciamiento de las boquillas debe prevenir zonas muertas de depósitos de sólidos. La principal ventaja de este tipo de unidades es que pueden manejar suspensiones más concentradas.

Las centrífugas de discos en general poseen una gran capacidad de sedimentación debido principalmente a su gran área, a sus cortas distancias de sedimentación y a los altos campos centrífugos que generan. Por otro lado, requieren de medidas de higiene y seguridad especiales como: a) manejo mecánico seguro, b) protección contra ruido y daños corporales y c) protección contra incendios, explosiones o diseminación de sustancias tóxicas o contaminantes.

4.3.2. Equipos de Filtración Centrífuga

Los equipos de filtración centrífuga constan de una tina o canasta perforada la cual está recubierta con un medio filtrante (una tela o membrana). La suspensión de sólidos es alimentada a la tina que al girar a altas velocidades provoca el depósito de sólidos sobre el medio filtrante y la salida de líquido claro. Estos equipos funcionan como un filtro, sólo que la fuerza impulsora del filtrado es la centrífuga y no una diferencia de presión (Fig. 4.11).

4.4. Diseño de Equipo de Centrifugación

El diseño de los equipos de centrifugación está basado en la teoría de sedimentación, lo cual puede visualizarse más fácilmente en el caso de las centrífugas tubulares debido a la sencillez de su geometría. Este análisis puede ser extendido al caso de las centrífugas de discos. Por otro lado, los equipos que operan por filtración centrífuga presentan variantes de diseño respecto a los dos anteriores. Con base a lo anterior esta sección se centra en cuatro aspectos:

- Diseño de Centrífugas Tubulares.
- Diseño de Centrífugas de Discos.

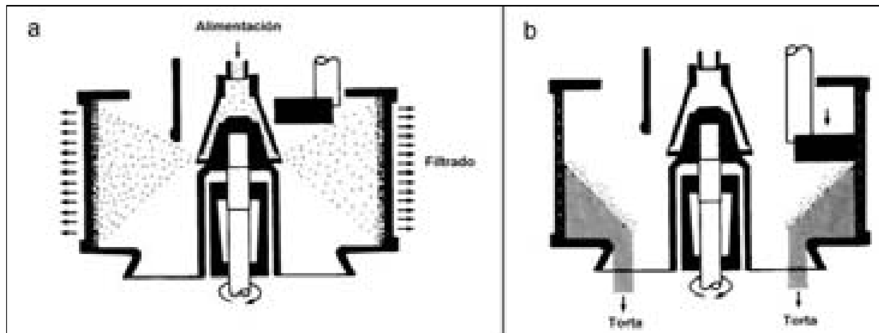


Figura 4.11: Centrífuga de canasta perforada. Fuente: Jacobs y Penney, 1987. a) Carga y b) Descarga. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons. Copyright ©1987. Todos los derechos reservados.

- Escalamiento de Centrífugas.
- Diseño de Equipo de Filtración Centrífuga.

4.4.1. Diseño de Centrífugas Tubulares

En el diseño de los equipos de centrifugación se deben considerar los siguientes hechos:

a) De acuerdo con la teoría de sedimentación desarrollada en la sección 4.2, las propiedades del caldo (tamaño de partícula, diferencia de densidad entre el sólido y el líquido, y la viscosidad del líquido), la velocidad de rotación y el radio del giro de la centrífuga, determinan la velocidad de sedimentación que se puede lograr en un equipo de sedimentación centrífugo.

b) La velocidad de sedimentación conjuntamente con la distancia de sedimentación, determinan el tiempo de sedimentación.

c) El gasto o flujo de la alimentación determina el tiempo de residencia de las partículas en un equipo dado.

d) El gasto manejable en una sedimentación centrífuga depende de la geometría específica del equipo, de su velocidad de giro y de las propiedades del caldo.

e) Para producir un líquido libre de sólidos, el tiempo de sedimentación en el equipo debe ser igual o menor al tiempo de residencia de las partículas impuesto por el flujo o gasto volumétrico. Esto constituye una condición de diseño para este tipo de centrífugas.

La Figura 4.12 muestra un esquema de una centrífuga tubular que al girar forma una capa anular de líquido sobre la pared del tazón. La posición de las partículas en esta capa varía tanto por el flujo convectivo axial como por la sedimentación radial.

Se puede desarrollar un análisis sencillo e ilustrativo de la centrífuga tubular mediante las siguientes suposiciones:

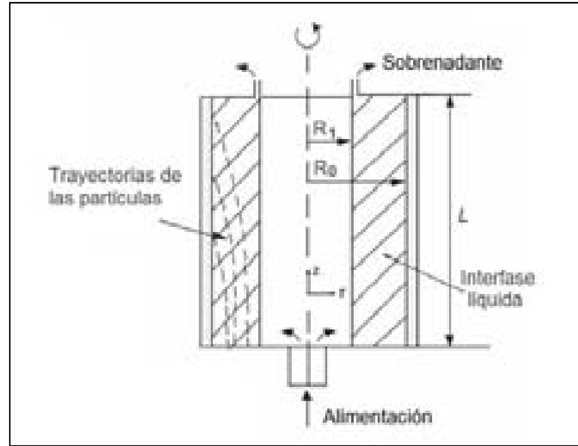


Figura 4.12: Esquema de una centrífuga tubular.

a) La alimentación es una solución diluida.
b) Las partículas se distribuyen uniformemente en la capa anular.
c) Las partículas sedimentan de acuerdo a la Ley de Stokes.
d) La distancia entre la superficie del líquido y la pared de la centrífuga es constante.
e) No existe retroflujo (flujo tapón).

En el análisis, primero se desarrolla una expresión para el tiempo de residencia en la centrífuga, luego una expresión para el tiempo de sedimentación y por último se combinan ambas expresiones para relacionar el gasto volumétrico manejable con las propiedades del caldo y la geomertría de la centrífuga.

Tiempo de residencia

En una centrífuga tubular la velocidad del fluido en el sentido axial está dada por:

$$v_z = \frac{dz}{dt} = \frac{Q}{A} \tag{4.7}$$

donde:

Q: Gasto volumétrico. $[L^3/t]$.

A: Área de flujo. $[L^2]$.

v_z: Velocidad de la partícula en el sentido axial. $[L/t]$.

De acuerdo a la Figura 4.12, el área de flujo es igual a la sección transversal de la capa anular de fluido y está dada por:

$$A = \pi R_o^2 - \pi R_1^2 = \pi(R_o^2 - R_1^2) \tag{4.8}$$

donde:

R_1: Distancia radial del eje de giro a la superficie del líquido. $[L]$.

R_o: Distancia del eje de giro a la pared del tazón. $[L]$.

Con los límites de integración apropiados se puede obtener una ecuación para el tiempo de residencia de las partículas dentro de la centrífuga empleando las ecuaciones (4.7) y (4.8), esto es:

$$\int_0^L dz = \frac{Q}{\pi(R_o^2 - R_1^2)} \int_0^{t_r} dt \tag{4.9}$$

donde:

L: Longitud de la centrífuga. $[L]$.

t_r: Tiempo de residencia de la partícula. $[t]$.

La integración de la ecuación anterior permite obtener la expresión para el tiempo de residencia de la partícula siguiente:

$$t_r = \frac{\pi(R_o^2 - R_1^2)L}{Q} \tag{4.10}$$

Tiempo de sedimentación y gasto volumétrico

Para desarrollar la expresión del tiempo de sedimentación de una partícula, que a su vez permita desarrollar una expresión para el gasto manejable en una centrífuga tubular, se consideran dos casos de interés:

Caso a) Tiempo para el 100 % de sedimentación.

Caso b) Tiempo para el 50 % sedimentación.

Tiempo para el 100 % de sedimentación y gasto volumétrico El tiempo de sedimentación t_s de una partícula localizada en la superficie de la capa anular del fluido en R_1 (que es la más alejada de la pared, o más dificil de sedimentar), puede ser obtenido a partir de la Ley de Stokes considerando el movimiento de la partícula en el sentido radial,

$$v_r = \frac{dr}{dt} = \frac{d_p^2 \Delta\rho\ \omega^2 r}{18\mu} \tag{4.11}$$

en este caso, inicialmente la partícula se localiza en R_1 y en el momento t_s alcanza la pared en R_o, de tal manera que:

$$\int_{R_1}^{R_o} \frac{dr}{r} = \frac{d_p^2 \Delta\rho\omega^2}{18\mu} \int_0^{t_s} dt \tag{4.12}$$

y la expresión para el tiempo de sedimentación de la partícula en este caso es:

$$t_s = \frac{18\mu}{d_p^2 \Delta\rho\omega^2} \ln\left(\frac{R_o}{R_1}\right) \tag{4.13}$$

Es más conveniente expresar la ecuación (4.13) en términos de υ_g dada por la ecuación (4.4), para obtener:

$$t_s = \frac{g}{\upsilon_g \omega^2} \ln\left(\frac{R_o}{R_1}\right) \tag{4.14}$$

La condición de diseño donde el tiempo de sedimentación debe ser menor o igual al tiempo de residencia, puede alcanzarse mediante la igualación de las ecuaciones (4.10) y (4.14). Este resultado permite obtener una expresión para el gasto manejable en una centrífuga tubular para producir un líquido claro o lograr un 100 % de sedimentación. Esta expresión es la siguiente:

$$Q = (\upsilon_g) \left[\left(\frac{\pi\omega^2 L}{g}\right) \left(\frac{R_o^2 - R_1^2}{\ln\left(\frac{R_o}{R_1}\right)}\right) \right] \tag{4.15}$$

En el resultado anterior es importante hacer notar que el flujo permisible es función de las propiedades del caldo contenidas en υ_g, y de las características de la centrífuga contenidas en el paréntesis cuadrado de la derecha.

Tiempo para el 50 % de sedimentación y gasto volumétrico Es una práctica común en las bioseparaciones sólido-líquido, el que los equipos se especifiquen para la remoción del 50 % de las partículas de una suspensión de un tamaño dado o tamaño de corte. Otra interpretación del tamaño de corte, es la de especificar el tamaño de partícula para el cual todas las partículas mayores sedimentan en mayor proporción y todas las menores de ese tamaño sedimentan en menor proporción.

Si se considera que en la capa anular del líquido de una centrífuga tubular las partículas del sólido se distribuyen uniformemente, éstas se encontrarán en cantidades iguales en subcapas anulares de caldo de igual área transversal. El radio R_{50} que divide la capa anular en dos subcapas de igual volumen puede obtenerse de la igualdad siguiente:

$$\pi(R_o^2 - R_{50}^2)L = \pi(R_{50}^2 - R_1^2)L \tag{4.16}$$

de tal manera que:

$$R_{50} = \left(\frac{R_o^2 + R_1^2}{2} \right)^{1/2} \tag{4.17}$$

La ecuación (4.11) debe ser integrada para este caso con límites nuevos para expresarla en la forma siguiente:

$$\int_{R_{50}}^{R_o} \frac{dr}{r} = \frac{d_{50}^2 \Delta\rho\omega^2}{18\mu} \int_0^{t_s^{50}} dt \tag{4.18}$$

El resultado de la integración anterior expresado en términos de υ_g es:

$$t_s^{50} = \frac{g}{\upsilon_g \omega^2} \ln \left(\frac{R_o}{R_{50}} \right) \tag{4.19}$$

donde t_s^{50} es el tiempo para lograr un 50 % de sedimentación.

Combinando las ecuaciones (4.17) y (4.19) se obtiene la expresión para el tiempo de sedimentación en términos de parámetros medibles.

$$t_s^{50} = \frac{g}{\upsilon_g \omega^2} \ln \left[\frac{R_o}{\left(\frac{R_o^2 + R_1^2}{2} \right)^{1/2}} \right] \tag{4.20}$$

La igualación de las ecuaciones (4.10) y (4.20) permite obtener una expresión para el flujo para este caso:

$$Q_{50} = \upsilon_g \left(\frac{\pi\omega^2 L}{g} \right) \frac{R_o^2 - R_1^2}{\ln \left[\frac{R_o}{\left(\frac{R_o^2 + R_1^2}{2} \right)^{1/2}} \right]} \tag{4.21}$$

donde Q_{50} es el flujo para sedimentar el 50 % de las partículas de diámetro d_{50} en una centrífuga tubular.

La ecuación (4.21) puede ser expresada de otra forma considerando la siguiente igualdad:

$$\frac{2}{2} \ln \left[\frac{R_o}{\left(\frac{R_o^2 + R_1^2}{2} \right)^{1/2}} \right] = \frac{1}{2} \ln \left[\frac{R_o}{\left(\frac{R_o^2 + R_1^2}{2} \right)^{1/2}} \right]^2$$

para obtener:

$$Q_{50} = (2\upsilon_g)\left[\left(\frac{\pi\omega^2 L}{g}\right)\left(\frac{R_o^2 - R_1^2}{\ln\left(\dfrac{2R_o^2}{R_o^2 + R_1^2}\right)}\right)\right] \quad (4.22)$$

Definición de sigma El concepto sigma ha sido muy utilizado en el campo de la sedimentación centrífuga desde que éste fue desarrollado (Ambler, 1957; Boychyn *et al.*, 2000). Sigma es un área característica de cada tipo de centrífuga y se utiliza para efectuar comparaciones y escalamiento de equipo.

En el caso de la centrífuga tubular el valor de sigma puede ser definido a partir de la ecuación (4.15) como:

$$Q = \upsilon_g \Sigma$$

donde

$$\Sigma = \left(\frac{\pi\omega^2 L}{g}\right)\left[\frac{R_o^2 - R_1^2}{\ln\left(\dfrac{R_o}{R_1}\right)}\right]$$

o bien a partir de la ecuación (4.22) de la siguiente manera:

$$Q_{50\,\%} = 2\upsilon_g \Sigma \quad (4.23)$$

donde:

$$\Sigma = \left(\frac{\pi\omega^2 L}{g}\right)\left[\frac{R_o^2 - R_1^2}{\ln\left(\dfrac{2R_o^2}{R_o^2 + R_1^2}\right)}\right] \quad (4.24)$$

La ecuación (4.24) es la expresión básica del concepto sigma, el cual es una constante que contiene sólo parámetros relacionados a la geometría de la centrífuga y su velocidad angular (es independiente del tipo de caldo). Por otro lado υ_g se relaciona sólo con las propiedades del caldo y es independiente del tipo de centrífuga.

En la subsección (4.4.2) se presenta para las centrífugas de discos un desarrollo análogo al efectuado para la centrífuga tubular, obteniéndose también una expresión para sigma. La aplicación de este concepto a problemas de escalamiento se revisa en otra sección.

Ejemplo 4.4. Separación Centrífuga.

Al separar células de *E. coli* de un caldo diluido en una centrífuga tubular, se obtiene un líquido claro bajo las siguientes condiciones:

Propiedades del caldo		Carac. Centrífuga	
μ	0.001 N−s/m^2	N	$20,000$ rpm
$\Delta\rho$	50 kg/m^3	R_o	0.022 m
d_p	10^{-6} m	R_1	0.011 m
		L	0.2 m

Se desea utilizar la misma centrífuga para separar restos celulares de diámetro promedio 0.5×10^{-6} m. Se estima que la viscosidad del caldo se incrementa a $\mu = 0.004$ N−s/m^2 al salir del equipo de rompimiento celular.

Se pide:

a) Calcular el flujo manejado en la separación de células.

b) Calcular la relación de flujos para claridad completa de sobrenadante con respecto al flujo para 50 % de corte, en la separación de células.

c) Calcular el flujo para separación completa de los restos celulares.

Solución:

a) En el cálculo del flujo manejado en la separación de células se supone que todas las partículas de la suspensión sedimentan, entonces se utilizará la ecuación (4.15), para lo cual es necesario calcular primero υ_g.

Sustituyendo datos en la ecuación (4.4) se tiene:

$$\upsilon_g = \frac{(10^{-6}\ \mathrm{m})^2 \times \left(50\ \frac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m}^3}\right) \times 9.8\ \frac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}^2}}{18 \times \left(0.001\ \frac{\mathrm{N-s}}{\mathrm{m}^2}\right)\left(\frac{\frac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m-s}}}{\frac{\mathrm{N-s}}{\mathrm{m}^2}}\right)}$$

$$\upsilon_g = 2.7 \times 10^{-8}\ \frac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}} = 2.7 \times 10^{-6}\ \frac{\mathrm{cm}}{\mathrm{s}}$$

Mediante ecuación (4.15):

$$Q = \frac{\left(2.7 \times 10^{-6}\ \frac{\mathrm{cm}}{\mathrm{s}}\right) \times \pi \times \left(\frac{2\pi \times 20,000}{60}\right)^2\ \mathrm{s}^{-2} \times (20\ \mathrm{cm})}{\left(980\ \frac{\mathrm{cm}}{\mathrm{s}^2}\right)} \times \left[\frac{(2.2)^2 - (1.1)^2}{\ln\left(\frac{2.2}{1.1}\right)}\right]\ \mathrm{cm}^2$$

$$Q = 3.97\ \frac{\mathrm{cm}^3}{\mathrm{s}} = 14.31\ \frac{\mathrm{L}}{\mathrm{h}}$$

b) Para el cálculo del flujo a un corte del 50 % se utiliza la ecuación (4.22), sustituyendo valores se tiene:

$$
\begin{aligned}
Q_{50} &= \frac{2 \times \left(2.7 \times 10^{-6}\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}}\right) \times \pi \times \left(\dfrac{2\pi \times 20,000}{60}\right)^2 \text{s}^{-2} \times (20\ \text{cm})}{980\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}^2}} \\
&\quad \times \left[\frac{(2.2)^2 - (1.1)^2}{\ln\left(\dfrac{2 \times (2.2)^2}{2.2^2 + 1.1^2}\right)}\right] \text{cm}^2 \\
Q_{50} &= 11.72\ \frac{\text{cm}^3}{\text{s}} = 42.19\ \frac{\text{L}}{\text{h}}
\end{aligned}
$$

por lo tanto:

$$
\frac{Q_{50}}{Q} = \frac{42.19\ \dfrac{\text{L}}{\text{h}}}{14.31\ \dfrac{\text{L}}{\text{h}}} = 2.94
$$

También puede ser demostrado utilizando las ecuaciones (4.15) y (4.22) que:

$$
\frac{Q_{50}}{Q} = \frac{2\ ln\left(\dfrac{R_o}{R_1}\right)}{ln\left(\dfrac{2R_o^2}{R_o^2 + R_1^2}\right)}
$$

En la expresión anterior es importante hacer notar que cuando la película de fluido al interior de la centrífuga es muy delgada, R_1 tiende a R_o entonces:

$$
Q_{50} \doteq 2Q
$$

c) Para facilitar los cálculos se puede obtener el cociente de los flujos de cada tipo de caldo empleando la ecuación (4.15) y obtener:

$$
\frac{Q_R}{Q_C} = \frac{\dfrac{d_R^2}{\mu_R}}{\dfrac{d_C^2}{\mu_C}}
$$

donde el subíndice R se refiere a los restos celulares y el C a las células enteras

de tal manera que:

$$Q_R = \frac{Q_C \times d_R^2 \times \mu_C}{d_C^2 \times \mu_R}$$

$$Q_R = \frac{\left(3.97\ \frac{\text{cm}^3}{\text{s}}\right) \times \left(0.5 \times 10^{-4}\right)^2\ \text{cm}^2 \times \left(0.01\ \frac{\text{g}}{\text{cm}-\text{s}}\right)}{\left(1 \times 10^{-4}\right)^2\ \text{cm}^2 \times \left(0.04\ \frac{\text{g}}{\text{cm}-\text{s}}\right)}$$

$$Q_R = \frac{3.97}{16}\ \frac{\text{cm}^3}{\text{s}} = 0.89\ \frac{\text{L}}{\text{h}}$$

La reducción del tamaño de partícula y el aumento de viscosidad reduce dramáticamente la capacidad de la centrífuga.

4.4.2. Centrífuga de Discos

En esta sección se desarrolla un análisis para la centrífuga de discos análogo al efectuado para la centrífuga tubular. La geometría del sistema es diferente (Fig. 4.13), donde x es la distancia a lo largo del canal que forman los discos y y es la distancia normal a partir del disco inferior. La distancia del eje a la parte externa de los discos es R_0 y a la parte interna R_1. Los discos se sitúan con un ángulo θ. Entonces se puede intuir que la expresión para el cálculo del flujo en este caso también es diferente.

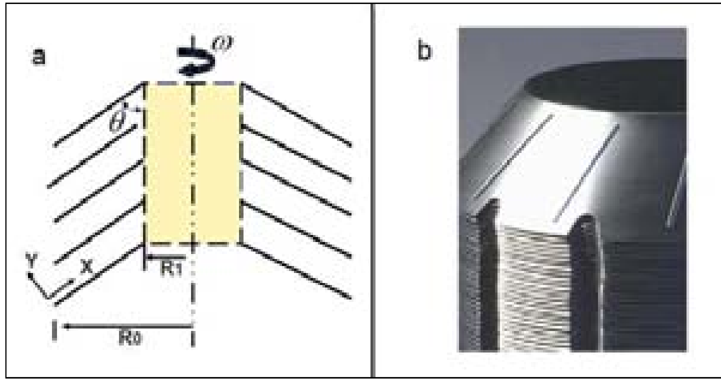


Figura 4.13: Centrífuga de discos. a) Esquema de diseño y b) Pila de discos.

El flujo se alimenta de tal manera que fluye hacia arriba a través de los espacios de los discos. En el sentido angular se supone que el líquido gira a la misma velocidad que los discos.

En el análisis se supone que el flujo global Q se divide equitativamente entre los espacios formados por todos los discos, de tal manera que el flujo en cada espacio es $Q_n = Q/n$, donde n es el número de espacios formados entre los discos.

Primero se desarrolla una expresión para el tiempo de residencia en la centrífuga, posteriormente una expresión para el tiempo de sedimentación, y finalmente se combinan ambas expresiones para relacionar el gasto volumétrico manejable con las propiedades del caldo y la geometría de la centrífuga.

Tiempo de residencia en una centrífuga de discos

En una centrífuga de discos la partícula que se desea sedimentar se mueve por convección y por sedimentación. El movimiento convectivo es paralelo a los discos y el movimiento por sedimentación es en sentido horizontal.

Si los ejes de referencia se fijan como aparece en la Figura 4.13, el movimiento producido por sedimentación tiene componentes tanto en x como en y, de tal manera que la velocidad neta de la partícula en la dirección x, es la resultante de la velocidad convectiva del fluido (aquí se supone que la partícula se mueve a la misma velocidad que el fluido) y la componente en x de la velocidad de sedimentación que se opone a este movimiento.

Una condición necesaria para alcanzar una separación efectiva, es que la velocidad convectiva de la partícula sea mucho mayor que el componente de la velocidad de sedimentación que actúa en sentido opuesto. En el siguiente desarrollo se parte de este supuesto cuando se analiza la velocidad de la partícula en el sentido x.

Expresión para v_x Para obtener una expresión del tiempo de residencia de una partícula en una centrífuga de discos es necesario primero desarrollar una expresión para la velocidad de la partícula en el sentido x, v_x.

En el desarrollo de la expresión para v_x se supone un arreglo geométrico sencillo como se muestra en la Figura 4.14.

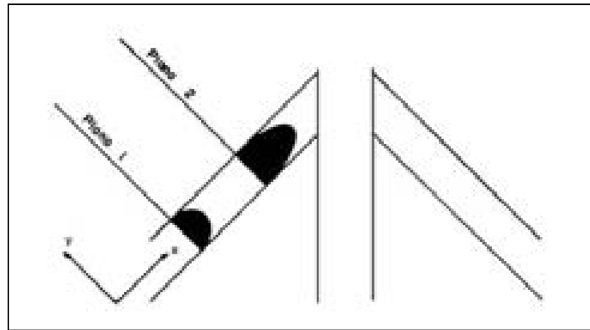


Figura 4.14: Perfil de velocidades en una centrífuga de discos.

La velocidad v_x varía con la distancia x dado que el gasto es constante en toda la sección de cada película y debido que la sección transversal de flujo disminuye conforme x aumenta (se supone que el líquido es incompresible). La

velocidad v_x también varía en el sentido y formando un perfil de velocidades con $v_x = 0$ en las superficies de los discos.

Si se considera una sección de película de longitud L, donde la velocidad v_x sólo depende de y pero no de x (o r); cuando se desprecian los efectos inerciales, se considera que el sistema se encuentra en el estado estacionario y el flujo es laminar, la ecuación de movimiento para este sistema puede ser escrita de la siguiente forma (Bird *et al.,* 2009):

$$\frac{\Delta P}{L} = -\mu \frac{d^2 v_x}{dy^2} \tag{4.25}$$

Esta expresión puede ser integrada dos veces entre los límites:

$$\text{Para } y = \frac{a}{2}\ ,\ v_x = 0$$

$$\text{Para } y = \frac{-a}{2}\ ,\ v_x = 0$$

y obtener la expresión:

$$v_x = \frac{\Delta P a^2}{8\mu L}\left[1 - \left(\frac{2y}{a}\right)^2\right] \tag{4.26}$$

donde a es el espesor de la película y P la presión.

La ecuación (4.26) se puede expresar en términos de Q_n si se integra a lo largo del área de flujo con los límites apropiados. Considerando que el área de flujo puede ser aproximada por un rectángulo de ancho a y largo $2\pi r$ entonces:

$$Q_n = \int_0^{2\pi r}\int_{\frac{-a}{2}}^{\frac{a}{2}} \frac{\Delta P a^2}{8\mu L}\left[1 - \left(\frac{2y}{a}\right)^2\right] dydz \tag{4.27}$$

donde Q_n es el flujo volumétrico entre dos discos de la centrífuga.

La integración de la ecuación (4.27) conduce a:

$$Q_n = \frac{\pi \Delta P a^3 r}{6\mu L} \tag{4.28}$$

Combinando las ecuaciones (4.26) y (4.28) se tiene que:

$$v_x = \left(\frac{3Q_n}{4\pi r a}\right)\left[1 - \left(\frac{2y}{a}\right)^2\right] \tag{4.29}$$

o bien en términos del flujo volumétrico total:

$$v_x = \left(\frac{3Q}{4n\pi r a}\right)\left[1 - \left(\frac{2y}{a}\right)^2\right] \tag{4.30}$$

La ecuación (4.30) describe el perfil de la velocidad de la película así como su comportamiento en diferentes planos (a diferentes r) en función de la velocidad promedio.

De la ecuación (4.30) se puede obtener una expresión para un diferencial de tiempo de residencia de la siguiente forma:

$$dt_r = \frac{dx}{\left(\frac{3Q}{4n\pi ra}\right)\left[1-\left(\frac{2y}{a}\right)^2\right]} \tag{4.31}$$

Cálculo del tiempo de sedimentación y el gasto volumétrico

Para desarrollar la expresión del tiempo de sedimentación de una partícula, que a su vez permita desarrollar una expresión para el gasto manejable en una centrífuga de discos, (al igual que se hizo para las centrífugas tubulares) se consideran dos casos de interés:

- Tiempo para el 100 % de sedimentación
- Tiempo para el 50 % de sedimentación.

Tiempo para el 100 % de sedimentación y gasto volumétrico En este caso la partícula más difícil de capturar se localiza en la parte inferior derecha de la película en ($x = 0$, $y = -a/2$), y la parte más lejana en la que puede sedimentar es en la parte superior izquierda de la película en [$x = (R_o - R_1)/\text{sen}\ \theta$, $y = a/2$].

La velocidad de sedimentación en el sentido radial está dada por la Ley de Stokes:

$$\frac{dr}{dt_s} = \upsilon_g \frac{\omega^2 r}{g} \tag{4.32}$$

por lo tanto:

$$dt_s = \frac{gdr}{\upsilon_g \omega^2 r} \tag{4.33}$$

La condición de diseño que establece que el tiempo de sedimentación debe ser menor o igual que el tiempo de residencia puede lograrse igualando las ecuaciones (4.31) y (4.33) para obtener la expresión:

$$\frac{gdr}{\upsilon_g \omega^2 r} = \frac{dx}{\frac{3Q}{4n\pi ra}\left[1-\left(\frac{2y}{a}\right)^2\right]} \tag{4.34}$$

de acuerdo a la geometría del sistema se puede efectuar el siguiente cambio de variables:

$$dy = \cos\theta dr$$

$$r = R_o - x\text{sen }\theta$$

con estas nuevas variables la ecuación (4.34) se transforma en:

$$\frac{3}{2a}\left[1-\left(\frac{2y}{a}\right)^2\right]dy = \left[\frac{2\pi n\upsilon_g\omega^2}{Qg}\right](R_o - x\text{sen }\theta)^2(\cos\theta dx) \qquad (4.35)$$

la ecuación (4.35) puede ser integrada utilizando el cambio de variable $u = (R_o - x\text{sen }\theta)$ y los límites siguientes:

$$\text{Para} \quad x = 0\ ,\ y = \frac{-a}{2}$$

$$\text{Para} \quad x = \frac{R_o - R_1}{\text{sen }\theta}\ ,\ y = \frac{a}{2}$$

obteniéndose:

$$Q = \upsilon_g\left[\frac{2\pi n\omega^2}{3g}(R_o^3 - R_1^3)\cot\theta\right] \qquad (4.36)$$

La ecuación anterior también puede ser expresada en función del parámetro Σ de la siguiente manera:

$$Q = \upsilon_g\Sigma \qquad (4.37)$$

donde Σ para este caso está definida por la expresión dentro del paréntesis cuadrado de la ecuación (4.36).

Tiempo para el 50 % de sedimentación y gasto volumétrico Para calcular el gasto que puede manejar la centrífuga para un corte del 50 %, debido a la separación tan pequeña de los discos una buena aproximación está dada por:

$$Q_{50} \doteq 2\upsilon_g\Sigma \qquad (4.38)$$

donde Σ está dada por la misma expresión que la de la ecuación (4.36) (ver Ejemplo 4.4 inciso b).

Ejemplo 4.5. Separación de *E. coli* mediante una centrífuga de discos.

Estimar el gasto volumétrico para producir un líquido claro de *E. coli* en una centrífuga de discos (Brunner, 1983) bajo las siguientes condiciones:

Datos Centrífuga		Datos caldo	
radio externo	8.1 cm	diámetro celular	0.8 μm
radio interno	3.6 cm	ρ celular	1.05 g/L
no.discos	72	ρ medio	1.02 g/L
velocidad	$8,400$ rpm	viscosidad	1.02×10^{-3} kg/m−s
ángulo	38°		

Solución:

El gasto de la centrífuga de discos puede ser calculado mediante la ecuación (4.36). Para aplicar esta ecuación es necesario calcular primero v_g. De acuerdo a la ecuación (4.4),

$$v_g = \frac{\left(0.8 \times 10^{-4}\ \text{cm}\right)^2 \times (1.05 - 1.02)\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 980\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}^2}}{18 \times 1.02 \times 10^{-3} \dfrac{\text{kg}}{\text{m} - \text{s}} \times \dfrac{10^3\ \text{g}}{\text{Kg}} \times \dfrac{\text{m}}{10^2\ \text{cm}}}$$

$$v_g = 1.02 \times 10^{-6}\ \frac{\text{cm}}{\text{s}}$$

en seguida se calcula Σ de la ecuación (4.36),

$$\Sigma = \left(\frac{2\pi \times 72}{3 \times 980\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}^2}}\right)\left(\frac{2\pi \times 8400}{60}\right)^2 \text{s}^{-2} \times (8.1^3 - 3.6^3)\ \text{cm}^3 \times \cot 38^\circ$$

$$\Sigma = 7.39 \times 10^7\ \text{cm}^2$$

El gasto volumétrico que puede manejar la centrífuga es:

$$Q = 1.02 \times 10^{-6}\ \frac{\text{cm}}{\text{s}} \times 7.39 \times 10^7\ \text{cm}^2$$

$$Q = 75.35\ \frac{\text{cm}^3}{\text{s}} = 271\ \frac{\text{L}}{\text{h}}$$

4.4.3. Escalamiento

En el análisis de la operación de la sedimentación centrífuga se han desarrollado expresiones para el cálculo del gasto manejable por una centrífuga de una geometría particular. Este enfoque es debido a que los equipos disponibles se construyen en tamaños específicos, de tal manera que gran parte del problema de separación centrífuga se reduce a una selección del equipo más que a un diseño específico para un trabajo particular. Por otro lado, las velocidades de sedimentación que se predicen con la Ley de Stokes pueden ser adecuadas para el caso de las centrífugas tubulares, pero pueden resultar hasta dos veces

mayores de las realmente obtenidas en las centrífugas de discos. En la selección de equipo de centrifugación una combinación adecuada de los principios teóricos con pruebas experimentales directamente con el material, es lo más recomendable.

Existen dos enfoques para el escalamiento de datos, uno basado en el tiempo equivalente de centrifugación y otro en el área de centrifugación.

Tiempo equivalente

Este enfoque consiste en determinar el tiempo equivalente dado por el producto Gt, donde G está dado por la ecuación (4.6) y t es el tiempo necesario para producir una centrifugación aceptable, de tal manera que la igualdad:

$$G_1 t_1 = G_2 t_2 \tag{4.39}$$

puede ser utilizada como un criterio de escalamiento. Los subíndices 1 y 2 se refieren a las escalas estudiadas.

Las pruebas de sedimentación de las muestras se pueden realizar en el laboratorio en una centrífuga de tubos o en una centrífuga de tazón. Las muestras se hacen girar a velocidades específicas a diferentes tiempos hasta producir un sobrenadante claro. El valor de Gt obtenido se usa para la selección de equipos a escala industrial.

La consistencia de los sólidos puede ser estudiada preliminarmente utilizando una varilla de laboratorio sobre la torta después de decantar el sobrenadante. En la Tabla 4.1 se presentan valores de Gt característicos de algunas partículas biológicas.

Tabla 4.1: Valores de Gt.

Partícula	G	t (min)	Gt (min)
Núcleo	600	5	3,000
Mitocondria	15,000	5	75,000
Ribosomas	100,000	60	6,000,000

Factor sigma

La expresión para calcular el factor Sigma de cada tipo de centrífuga es característica de cada geometría particular (Axelsson, 1985). Esta área característica o factor Σ ha sido empleada para escalar equipos con similitud geométrica. En la Tabla 4.2 se presentan los rangos de los factores Σ para diferentes tipos de centrífugas.

El escalamiento utilizando el factor sigma supone que para una misma suspensión, la velocidad de sedimentación de las partículas es independiente de la

Tabla 4.2: Factores Sigma.

Centrífuga	Σ (m^2)
Intermitente	20 - 200
Decantadora	150 - 2,500
Tubular	2,000 - 3,000
Discos	400 - 120,000

Fuente: Moir, 1988

escala. Este supuesto es más utilizado cuando se escalan centrífugas del mismo tipo, de tal manera que:

$$(v_g)_1 = (v_g)_2$$

y utilizando la ecuación (4.23) se obtiene:

$$\frac{Q_{50}^1}{\Sigma_1} = \frac{Q_{50}^2}{\Sigma_2} \tag{4.40}$$

Se debe recordar en este punto que la selección del equipo de centrifugación debe combinar la teoría, la experimentación directa con el material (incluyendo pruebas a nivel piloto) y la experiencia (Moir, 1988).

En la Tabla 4.3 se presenta una guía general para la selección de centrífugas sedimentadoras.

El tamaño de partícula a que se refiere la Tabla 4.3 está basado en la sedimentación en agua de esferas de cuarzo de densidad relativa 2.65. Para calcular el diámetro equivalente de las partículas de cuarzo, al de las partículas de interés en una suspensión dada, se establece que las velocidades de sedimentación son iguales en ambos medios, obteniendo la siguiente expresión:

$$d_c = \left[\left(\frac{\rho_p - \rho_L}{\rho_C - \rho_A}\right)\frac{\mu_A d_p^2}{\mu_L}\right]^{1/2} \tag{4.41}$$

donde:

ρ_C: Densidad del cuarzo (2.65). $[M/L^3]$.

ρ_p: Densidad de la partícula en suspensión. $[M/L^3]$.

ρ_L: Densidad del líquido. $[M/L^3]$.

ρ_A: Densidad del agua. $[M/L^3]$.

Tabla 4.3: Guía para la selección de centrífugas.

	Características manejables de la alimentación			
Tipo de Centrífuga	Tamaño de Partícula micras	Contenido Sólidos %	Prueba de Sedimentación a 1,000 G (min)	Prueba de Consistencia de los sólidos
Tubular	0.1 - 200	≤ 0.5	2 - 20	torta firme
Cámara múltiple	0.5 - 5,000	1 - 5	2 - 20	torta firme
Discos y boquillas	0.5 - 200	2 - 20	1 - 10	lodo
Discos tazón abierto	0.5 - 200	≤ 10	1 - 10	lodo
Discos y boquillas	0.5 - 200	≤ 10	1 - 10	lodo
Discos intermitente	0.25 - 200	≤ 1	1 - 10	torta firme
Tazón sólido	2 - 5,000	1 - 5	0 - 3	torta firme
Decantadora	2 - 5,000	2 - 60	0 - 3	lodo - torta
	Caractrísticas de procesamiento			
Tipo de Centrífuga	Método de descarga de sólidos	Capacidad lavado de torta	Flujo de la Alimentación L/min	Fuerza g Máxima
Tubular	Intermitente	Ninguna	8 - 120	12,000 - 16,000
Cámara múltiple	Intermitente	Ninguna	1.5 - 335	5,000 - 9,000
Discos y boquillas	Continuo	Moderada	38 - 3,780	5,000 - 8,500
Discos tazón abierto	Intermitente	Ninguna	3.8 - 1,500	5,000 - 7,000
Discos y boquillas	Intermitente	Ninguna	3.8 - 570	14,000 - 15,000
Discos intermitente	Intermitente	Ninguna	0.38 - 1,500	5,000 - 8,000
Tazón sólido	Intermitente	Ninguna	1.5 - 250	500 - 800
Decantadora	Continuo	Moderada	3.8 - 1,890	2,000 - 3,200

Adaptada de: Moir, 1988

μ_A: Viscosidad del agua. $[M/L-t]$.

μ_L: Viscosidad del líquido. $[M/L-t]$.

d_p: Diámetro partícula. $[L]$.

d_c: Diámetro equivalente de una esfera de cuarzo. $[L]$.

Ejemplo 4.6. Área de centrifugación.

Una centrífuga de discos de laboratorio produce un sobrenadante claro con una alimentación de 2.1 L/h de una solución diluida de células. El área característica de la centrífuga es de 233 m^2.

Se pide:

Estimar el área necesaria para manejar un flujo de $1,000$ L/h en una centrífuga similar.

Solución:

Para el caso del manejo de un flujo claro a la salida de la centrífuga:

$$\frac{Q_1}{\Sigma_1} = \frac{Q_2}{\Sigma_2}$$

1 nivel laboratorio, **2** nivel industrial.

Sustituyendo valores,

$$\Sigma_2 = \frac{Q_2 \Sigma_1}{Q_1} = \frac{\left(1000\ \frac{\mathrm{L}}{\mathrm{h}}\right) \times (233\ \mathrm{m}^2)}{2.1\ \frac{\mathrm{L}}{\mathrm{h}}} = 111,000\ \mathrm{m}^2$$

4.4.4. Filtración Centrífuga

La filtración centrífuga combina los dos principios de separación mecánica: filtración y centrifugación. La aplicación de este método ha conducido al desarrollo de diferentes tipos de equipos de diferentes geometrías y formas de descarga de la torta. En esta sección el tratamiento se limita al de geometría cilíndrica.

Considérese una tina o canasta de una operación de filtración centrífuga (Fig. 4.15) donde se alimenta la suspensión a tratar, y por acción de la fuerza centrífuga se forma una torta homogénea sobre la pared de la tina.

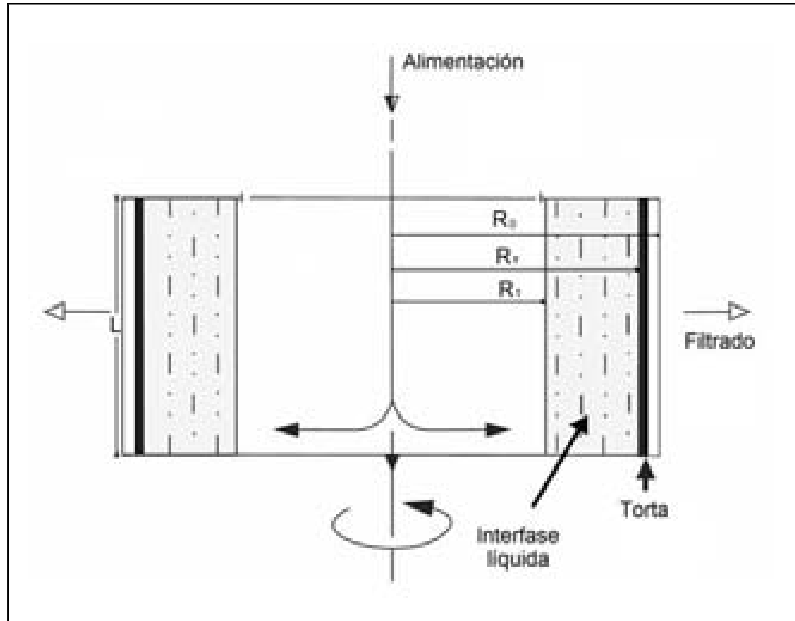


Figura 4.15: Filtración centrífuga.

La canasta perforada tiene un radio R_o y está recubierta de un medio filtrante de resistencia despreciable. En un instante t durante la operación, la superficie del líquido está localizada en R_1 y la interfase líquido-sólido se localiza en R_T.

Generalmente el interés de diseño es contar con expresiones para el cálculo del gasto volumétrico manejable por la centrífuga y del tiempo de filtrado para realizar una determinada operación en un equipo dado.

Gasto volumétrico Q

El gasto volumétrico a través de la torta en una operación de filtración centrífuga, está relacionado con la ecuación de D'arcy para medios porosos. Debido a que la torta no es plana, el área de filtrado varía con r, entonces la ecuación de D'arcy debe expresarse en forma diferencial como:

$$\frac{dP}{dr} = -\mu\alpha\rho_o\upsilon \tag{4.42}$$

donde υ es la velocidad superficial de filtrado.

En el instante t el flujo volumétrico Q en la dirección radial es constante a lo largo del espesor de la torta, y se relaciona con la velocidad de filtración (variable a lo largo del espesor de la torta) mediante la siguiente expresión:

$$\upsilon = \frac{Q}{2\pi r\ell} \tag{4.43}$$

donde ℓ es la altura de la canasta de la centrífuga.

Combinando las ecuaciones (4.42) y (4.43) se obtiene:

$$\frac{dP}{dr} = -\mu\alpha\rho_o\frac{Q}{2\pi r\ell} \tag{4.44}$$

la ecuación (4.44) puede ser integrada entre R_o y R_T para encontrar la caída de presión en la torta:

$$\Delta P = \left(\frac{\mu\alpha\rho_o Q}{2\pi\ell}\right)\ ln\left(\frac{R_o}{R_T}\right) \tag{4.45}$$

El gradiente de presión generado por el movimiento circular del líquido puede ser calculado utilizando la expresión:

$$\frac{dP}{dr} = \rho_L\omega^2 r \tag{4.46}$$

donde ρ_L es la densidad del líquido.

Integrando la ecuación (4.46) entre R_o y R_1 se puede encontrar una expresión para el gradiente de presión generado por la fuerza centrífuga. Esta expresión es:

$$\Delta P = \frac{\rho_L\omega^2}{2}\left(R_o^2 - R_1^2\right) \tag{4.47}$$

La ecuación (4.47) puede ser sustituida en la ecuación (4.45) para obtener una expresión del gasto volumétrico en cualquier instante t, obteniéndose:

$$Q = \frac{\pi\omega^2\rho_L\ \ell}{\mu\alpha\rho_o}\left[\frac{R_o^2 - R_1^2}{\ln\left(\frac{R_o}{R_T}\right)}\right] \tag{4.48}$$

La ecuación anterior concuerda con el hecho que durante una operación de filtración centrífuga, R_T disminuye conforme transcurre el tiempo de filtración (al aumentar el espesor de la torta), disminuyendo también Q.

Tiempo de Filtración Centrífuga

La ecuación (4.48) puede ser utilizada para desarrollar una expresión para calcular el tiempo necesario para procesar un volumen de caldo dado (o una torta de un espesor físicamente alcanzable). Es necesario efectuar primero algunos cambios de variables.

El gasto volumétrico Q puede ser relacionado con el volumen de filtrado por la ecuación:

$$Q = \frac{dV}{dt} \tag{4.49}$$

Por medio de un balance de masa en la película cilíndrica que forma la torta se obtiene que:

$$\rho_o V = \rho_T\left[\pi\left(R_o^2 - R_T^2\right)\ell\right] \tag{4.50}$$

donde ρ_T es la densidad de la torta en peso seco por unidad de volumen. A partir de la ecuación (4.50) se puede definir el diferencial de volumen de filtrado siguiente:

$$dV = \left(\frac{-2\rho_T\pi\ell}{\rho_o}\right)R_T dR_T \tag{4.51}$$

Combinando las ecuaciones (4.48), (4.49) y (4.51) e integrando la expresión resultante entre los límites:

$$t = 0 \qquad R_T = R_o$$

$$t = t \qquad R_T = R_T$$

se obtiene la siguiente solución:

$$t = \frac{\mu\alpha\rho_T R_T^2}{2\rho_L\omega^2(R_o^2 - R_1^2)}\left[\left(\frac{R_o}{R_T}\right)^2 - 1 - 2\ln\left(\frac{R_o}{R_T}\right)\right] \tag{4.52}$$

donde t es el tiempo necesario para obtener una torta de espesor $(R_o - R_T)$.

De acuerdo a la ecuación (4.52) el tiempo de filtrado es función de la resistencia específica de la torta entre otros parámetros. Debido a que la torta puede

sufrir compactación cuando se expone a un campo centrífugo, las mediciones de resistencia específica hechas en equipos de laboratorio de filtración por lotes pueden conducir a resultados incorrectos. Entonces, es preferible realizar estas mediciones en equipo de laboratorio apropiado para la filtración centrífuga.

Ejemplo 4.7. Tiempo de Filtración.

Se desea estimar el tiempo de filtración centrífuga de 1,600 L de una suspensión que contiene 0.02 g/cm^3 de una hormona. Las pruebas de laboratorio indican que la torta que forma esta suspensión tiene una resistencia específica de 2.67×10^{10} cm/g y una densidad de 1.1 g/cm^3 de sólidos secos de torta húmeda. Las propiedades del líquido pueden ser consideradas iguales a las del agua.

La centrífuga que se va a utilizar gira a 650 rpm, tiene un radio de 51 cm y una altura de 45 cm. Una vez llena la centrífuga y girando puede formar una película de 5.5 cm de líquido y torta.

Solución: El tiempo para la filtración puede ser calculado con la ecuación (4.52). Para tal efecto es necesario calcular primero la localización de la superficie de la torta R_T mediante la ecuación (4.50) de tal manera que:

$$
\begin{aligned}
R_T &= \left[R_o^2 - \left(\frac{\rho_o V}{\rho_T \pi \ell}\right)\right]^{1/2} \\
R_T &= \left[51^2 \text{ cm}^2 - \left(\frac{0.02 \ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 1600 \times 10^3 \text{ cm}^3}{1.1 \ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times \pi \times \ 45 \text{ cm}}\right)\right]^{1/2} = 48.9 \text{ cm}
\end{aligned}
$$

entonces de acuerdo a la ecuación (4.52) el tiempo de filtración es:

$$
\begin{aligned}
t &= \left(\frac{\mu \alpha \rho_T R_T^2}{2\rho_L \omega^2 (R_o^2 - R_1^2)}\right)\left[\left(\frac{R_o}{R_T}\right)^2 - 1 - 2\ln\left(\frac{R_o}{R_T}\right)\right] \\
t &= \left(\frac{0.01 \dfrac{\text{g}}{\text{cm}-\text{s}} \times 2.67 \times 10^{10} \ \dfrac{\text{cm}}{\text{g}} \times 1.1 \ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 48.9^2 \text{ cm}^2}{2 \times 1 \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times \left(\dfrac{650 \times 2\pi}{60}\right)^2 \text{s}^{-2} \times (51^2 - 45.5^2) \text{ cm}^2}\right) \\
&\quad \times \left[\left(\frac{51}{48.9}\right)^2 - 1 - 2\ln\left(\frac{51}{48.9}\right)\right] \\
t &= 8.6 \text{ min}
\end{aligned}
$$

4.5. Sumario

La centrifugación se emplea para separar diversos tipos de sólidos (células, desechos, precipitados y cuerpos de inclusión) de caldos biológicos. La teoría de

la sedimentación combinada con la experimentación en equipos pilotos, permite operar y diseñar racionalmente los equipos de centrifugación.

Existen varios tipos de equipos para efectuar la operación de centrifugación los cuales pueden operar tanto en forma intermitente como en forma continua.

De acuerdo con la teoría de la sedimentación, el gasto manejable en una centrífuga depende de la geometría específica del equipo, de la velocidad de giro y de las propiedades del caldo que se desea procesar.

4.6. Problemas

4.1. Velocidad de sedimentación. Una partícula de 5 μm de diámetro y $1,100$ kg/m^3 de densidad, sedimenta en agua a 20 $°C$ con una viscosidad de 1.01×10^{-3} N−s/m^2 y una densidad de 1,000 kg/m^3.

Se pide: Estimar la velocidad de sedimentación cuando:

a) Sedimenta libremente.

b) Se localiza en un punto $r = 0.15$ m y gira a $3,000$ rpm.

Resp. a) 1.35×10^{-6} m/s y b) 2.04×10^{-3} m/s

4.2. Centrífuga tubular. Una centrífuga tubular de 12.4× 72.5 cm gira a una velocidad tal que genera un campo de $15,600$ G. La película que forma el líquido al girar tiene un espesor de 5 cm.

Se pide: Estimar el gasto volumétrico que puede manejar este equipo en la separación de restos celulares de *E. coli* que presentan un diámetro promedio de 0.25 μm y se encuentran en una solución con 4.0 cP de viscosidad. La diferencia de densidad entre las partículas y la solución es de 0.03 g/cm^3.

Resp. 1.18 L/h

4.3. Área característica. Estimar el área característica de centrifugación para procesar 3.34×10^{-3} m^3/s de un caldo de cultivo bacteriano. Las células del caldo presentan un diámetro promedio de 1 μm y una densidad de 1096.7 kg/m^3. La viscosidad del caldo es de 2.682×10^{-3} N−s/m^2 y su densidad de 997 kg/m^3.

Resp. $82,670$ m^2

4.4. Efecto de las condiciones de centrifugación. Una centrífuga tubular que gira a $4,000$ rpm cuando se alimenta con un caldo de levaduras a razón de 12 L/min, logra recuperar el 60 % de sólidos.

Se pide estimar:

a) La velocidad a la que debe girar la centrífuga para obtener un 95 % de recuperación.

b) El flujo que puede ser alimentado a la centrífuga cuando gira a $4,000$ rpm y se desea una recuperación del 95 %.

Resp. a) $4,845$ rpm y b) 8.18 L/min

4.5. Recuperación primaria. El procesamiento inicial de $30,000$ L de un caldo celular que contiene 0.15 L/L de células (base húmeda de sólidos) es necesario realizarlo de acuerdo a las siguientes tres etapas:

i) Concentración del caldo hasta 0.8 L/L.

ii) Resuspensión del caldo en una solución amortiguadora apropiada hasta 0.5 L/L.

iii) Rompimiento de las células mediante un homogeneizador. Los restos celulares obtenidos en este paso tienen la mitad del diámetro de las células originales y el caldo es cuatro veces más viscoso.

iv) Separación de los restos celulares del homogeneizado. Este paso debe ser realizado en menos de 15 h para evitar degradación del producto.

Se pide establecer:

a) El número de centrífugas con capacidad de 400 L/h de homogeneizado para realizar el paso iv).

b) El tiempo necesario para el paso iv).

c) El tiempo necesario para realizar el paso i) con el mismo equipo.

d) De que otra forma se puede realizar este proceso.

Resp. a) 2; b) 11.25 h y c) 2.34 h

4.6. Extracción en un SDFA. En una operación para la obtención de una enzima se utiliza un sistema de extracción de dos fases acuosas inmiscibles (SDFA). Una vez realizada la extracción las fases se separan mediante una centrífuga tubular. Las propiedades de las fases son las siguientes:

Fase Ligera (B)		**Fase Pesada (A)**	
Nombre	PEG 4000 9 %	Nombre	Dextrano T 5000 2 %
Densidad	1046 kg/m^3	Densidad	1144 kg/m^3
Viscosidad	0.008 kg/m−s	Viscosidad	0.008 kg/m−s
Temperatura	20 $^\circ C$	Temperatura	20 $^\circ C$

La centrífuga gira a $12,000$ rpm, tiene un radio externo $R_o = 0.05$ m y una longitud $L = 0.9$ m.

La salida de la fase pesada en la centrífuga se localiza a una distancia radial $R_B = 0.02\ m$. La salida de la fase ligera se localiza en $R_A = 0.022\ m$ mediante un arreglo que la coloca por encima de la fase ligera, de tal manera que la interfase líquido-líquido se forma a una distancia R_i mayor que R_A.

Se pide:

a) Desarrollar una expresión para obtener el gradiente de presión generado por la fase ligera al girar.

b) Desarrollar una expresión para obtener el gradiente de presión generado por la fase pesada al girar.

c) Desarrollar una expresión para el cálculo de la posición de la interfase suponiendo que los gradientes anteriores son iguales.

d) Calcular la posición de la interfase.

Resp. d) 3.76×10^{-2} m

4.7. Extraccion en un SDFA. La centrífuga del problema anterior se alimenta con un flujo de 1×10^{-4} m^3/s de una mezcla de las fases que se encuentra en una proporción de 3.5:1 de fase pesada a fase ligera.

Se pide:

a) Calcular el flujo de la fase ligera que se alimenta a la centrífuga.

b) Utilizando la ecuación (4.15) calcular la velocidad de sedimentación mínima para la fase pesada en la fase ligera.

c) Calcular el diámetro mínimo de las gotas de fase pesada para obtener un 100 % de separación de las fases.

Resp. a) 7.78×10^{-5} m^3/s y b) 4 μm

4.8. Escalamiento de una centrifuga tubular. La extracción líquido-líquido del problema anterior se desea escalar utilizando una centrífuga más grande donde: $R_B = 0.06$ m, $R_A = 0.066$ m, $L = 1.5$ m y $N = 8,000$ rpm.

Partiendo de que cuando se maneja el flujo de 1×10^{-4} m^3/s en la centrífuga más chica se tiene una separación adecuada de las fases y sea: **1**: operación en el equipo menor y **2**: operación en el equipo mayor.

Se pide calcular:

a) $(\Sigma_B)_1$

b) $(R_i)_2$

c) $(\Sigma_B)_2$

d) $(Q_B)_2$

e) El gasto total que puede manejar la nueva centrífuga.

Resp. a) 730 m^2; c) 4,782 m^2; d) 6.56×10^{-4} m^3/s.

4.9. Centrífuga de tubos. Se desea procesar una suspensión diluida de levaduras de 10 μm de diámetro y densidad de 1.01 g/cm^3, con una centrífuga de tubos que opera a 8,000 rpm. Los tubos se llenan con la suspensión hasta una altura de 5 cm. Cuando la centrífuga está operando los tubos giran perpendicularmente al eje y el fondo de los tubos se localiza a 9 cm del eje.

Se **pide:** Estimar el tiempo para sedimentar la mitad de las partículas si se supone que éstas se distribuyen en forma uniforme en la suspensión. Las propiedades del líquido pueden ser tomadas como las del agua.

4.10. Selección de equipo de centrifugación. Se desea procesar 1,000 L/min de una suspensión que contiene 20 % de levaduras. En pruebas de laboratorio la suspensión puede clarificarse en 6 min a 1,000 G. Se desea descargar los sólidos continuamente. La torta que forman los sólidos es bastante fluida.

Se pide: Con base a los datos anteriores y utilizando la Tabla 4.3 efectuar la selección de una centrífuga.

4.11. Centrífuga de discos. Una centrífuga de discos recupera el 50 % de células a un gasto de 10 L/min.

Se pide: Calcular el gasto que puede manejar la centrífuga para lograr 80 % de recuperación.

4.12. Velocidad y tiempo de sedimentación terminal. Una partícula de 1.0 μm y densidad de 1.06 g/cm^3 se sedimenta en agua de densidad 1.00 g/cm^3 y viscosidad de 0.01 g/cm−s.

Se pide:

a) Calcular la velocidad terminal de la partícula v_∞.

b) Obtener una expresión para el tiempo que tarda la partícula para alcanzar el 99 % de su velocidad terminal (t_{99}).

c) Calcular el tiempo t_{99}.

d) Obtener una expresión para el cálculo de la distancia recorrida por la partícula al momento de alcanzar el 99 % de su velocidad terminal (x_{99}).

e) Calcular x_{99}

Resp. b) $t_{99} = 4.6\left(d_p^2\rho_p/18\mu\right)$ y d) $x_{99} = 0.784\ v_\infty t$

Problema 4.13. Separación de componentes sanguíneos. La centrifugación es un método comúnmente empleado para separar células sanguíneas de las plaquetas en sangre. Los diámetros de estas partículas son de 10 y 2 μm, respectivamente. La densidad específica de ambos tipos de partículas es de 1.03.

Se coloca dentro de un tubo una muestra de sangre sobre la superficie de un líquido cuya viscosidad es de 0.02 g/cm$-$s y su densidad específica de 1.01, a una distancia de 20 cm del eje de rotación de una centrífuga. Los tubos giran perpendicularmente al eje a una velocidad de 500 rpm.

Se pide:

Determinar el tiempo de centrifugación para lograr una separación de 1.0 cm entre los dos tipos de partículas.

Resp. 328 s

Problema 4.14. Incremento en la velocidad angular. Se separan células de 10 mm de diámetro de un medio de cultivo en una centrífuga de tubos que opera a 500 rpm por 10 min. La superficie del líquido del tubo se localiza a 5 cm del eje de rotación y el tramo de sedimentación en el tubo es de 5 cm.

Se pide:

Calcular las rpm necesarias para reducir el tiempo de centrifugación 5 min.

Resp. 707 rpm

Problema 4.15. Centrífuga de ángulo fijo. Una centrífuga de mesa puede manejar 6 microtubos de 0.8 cm de diámetro y 3 cm de altura, colocados a 45° respecto al eje de rotación. La parte superior de cada tubo se encuentra a una distancia de 3.7 cm respecto al eje de rotación.

Se pide: Estimar el tiempo para clarificar una solución acuosa diluida que contiene partículas de 0.2 μm de diámetro y una diferencia de densidad de 0.002 g/cm^3, si la centrífuga puede girar a $95,000$ rpm.

Resp. 17 min.

Problema 4.16. Desescalamiento. Una centrífuga industrial de 91.5 cm de diámetro opera a 1000 rpm.

Se pide: A qué velocidad debe operar una centrífuga de laboratorio de 15 cm de diámetro para duplicar la capacidad de la centrífuga industrial.

Resp. 3493 rpm

Problema 4.17. Escalamiento geométrico. Una centrífuga de discos se utiliza en una planta piloto para separar levaduras de un caldo de cultivo, bajo las siguientes condiciones:

R_1	5 cm
R_0	25 cm
ω	5000 rpm
Q	10 L/min
conc. celular	10 g/L
diámetro células	3 μm
densidad células	1.03 g/cm^3
viscosidad	1.1 cP
densidad del fluido	1.01 g/cm^3

A nivel de producción se requiere procesar 500 L/min del mismo tipo de caldo. La centrífuga que será utilizada operará a 3500 rpm y tendrá una geometría similar a la centrífuga piloto, es decir el mismo número de discos y el mismo ángulo de rotación. Los radios de los discos, R_0 y R_1, de la centrífuga grande serán el doble de los utilizados en la centrífuga de nivel piloto.

Se pide:

Calcular el número de centrífugas necesarias a nivel de producción.

Resp. 13

Problema 4.18. En el desarrollo de un proceso para producir una proteína recombinante en *E. coli* se cuenta con una centrífuga de discos a nivel piloto. Durante la cosecha celular la centrífuga puede manejar hasta 200 L/h, considerando que el diámetro promedio de las células es de 1.0 μm.

La centrífuga también puede ser empleada para que una vez rotas las células, se puedan separar los cuerpos de inclusión (que forman las proteínas) de los restos celulares presentes en el caldo. Esto es debido a la gran densidad de los cuerpos de inclusión de 1.3 g/cm^3, no obstante que su diámetro promedio oscila entre 0.3 y 0.7 μm.

Se pide:

a) Calcular el área efectiva de la centrífuga.

b) Calcular el flujo que puede manejar la centrífuga para separar los cuerpos de inclusión.

Establecer las suposiciones empleadas en la solución.

Resp. a) 2041 m^2 y b) 54 L/h

4.7. Bibliografía

Amirante, R.; Catalano, P. **2000**. Fluid dynamic analysis of the solid-liquid separation process by centrifugation. *J. Agric. Engng. Res.* 77, 193-201.

Ambler, C.M. **1961**. Centrifugation equipment: Theory. *Ind. Eng. Chem.* 53, 6, 429-433.

Axelsson, H.A. **1985**. Centrifugation. En: *Comprehensive Biotechnology.* Moo Young, M. (Ed.). Pergamon Press. Oxford. Sección 2, Cap. 21, 325-330.

Bailey, J.E.; Ollis, D.F. **1986**. *Biochemical Engineering Fundamentals.* Segunda Edición. McGraw-Hill. New York. 1, 10.

Bell, D.J.; Hoare, M.; Dunnill, P. **1983**. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. En: *Advances in Biochemical Enginnering /Biotechnology.* Vol. 26, Downstream Processing. Springer-Verlag. New York. 1-72.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley and Sons. New York. 3, 47-75.

Bird, R.B.; Stewart, W.E.; Lightfoot, E.N. **1964**. *Fenómenos de transporte.* Reverté, S.A. México. 6-14.

Bird, R.B.; Stewart, W.E.; Lightfoot, E.N. **2002**. *Transport Phenomena.* John Wiley and Sons. New, York. 2da Edición. p. 187.

Bjurstrom, E. **1985**. Biothechnology. *Chem. Eng.* 92, 126-158.

Boychyn, M.; Doyle, W.; Bulmer, M.; J. More, J.; Hoare, M. **2000**. Laboratory scaledown of protein purification processes involving fractional precipitation and centrifugal recovery. *Biotech. Bioeng.* 69, 2-10.

Brunner, K.H. **1983**. Separators in biotechnology: A new challenge to the centrifuge manufacturer? Westfalia Separators AG. Oelde, Alemania.

Brunner, K.H; Hemfort, H. **1988**. Centrifugal Separation in Biotechnological Process. En: Downstream Process: Equipment and Techniques. *Advances in Biotechnological Processes.* Vol 8. Mizrahi, A. (Ed.). Alan R. Liss. New York. 1-50.

Jacobs, L.J.; Penney, W.R. **1987**. Phase segregation. En: *Handbook of Separation Process Technology.* Rousseau, R.W. (Ed.). John Wiley and Sons. New York. 3, 129-196.

Moir, D.N. **1988**. Sedimentation centrifuges. *Chem. Eng.* 95, 42-51.

Roush, D.J.; Lu, Y. **2008**. Advances in primary recovery: Centrifugation and membrane technology. *Biotechnol. Prog.* 24, 488-495.

Svarovsky, L. **2000**. *Solid-liquid separations.* Butterworth Heinemann. 4ta Edición. Woburn Ma.

Wiesmann, U.; Binder, H. **1982**. Biomass separation from liquids by sedimentation and centrifugation. *Adv. Biochem. Eng.* 24, 119-171.

Capítulo 5

Rompimiento de Células

5.1. Introducción

El rompimiento celular es una operación unitaria de gran importancia industrial. Algunos de los productos biotecnológicos producidos a escala industrial son extracelulares y no requieren ser extraídos de la célula. Cuando el producto de interés es intracelular (Tabla 5.1), una vez realizada la cosecha de células una operación necesaria para la liberación del producto es el rompimiento de la célula misma (Petrides *et al.,* 1989).

Tabla 5.1: Productos que requieren de una ruptura celular.

Tipo de Producto	Ejemplos
Proteínas recombinantes	Insulina, HC, Proteína A, Proteína G.
Enzimas	l-Asparaginasa, Invertasa, Glucocinasa.
Plásmidos	Terapia génica
Vacunas	Tétanos, Meningitis.
Otros	Mitocondrias, Esporas, Toxinas.

Adaptada de: Foster, 1992

Algunas proteínas eucarióticas recombinantes producidas en microorganismos procariotes, no son secretadas por la célula recombinante y constituyen productos intracelulares, los cuales pueden estar en forma activa o en forma desnaturalizada. Las proteínas intracelulares desnaturalizadas con frecuencia forman cuerpos de inclusión insolubles.

Otras proteínas de interés permanecen en el espacio periplásmico entre la membrana y la pared celular. Sólo algunas células presentan mecanismos de

secreción celular del producto de interés. Esto hace necesario contar con técnicas de rompimiento celular eficientes y selectivas en la producción de proteína intracelular.

La técnica de rompimiento celular seleccionada determina el tamaño de los desechos resultantes y la influencia que éstos tendrán en las operaciones que se utilicen para su separación. Asimismo, la técnica es función del tipo de microorganismo que contiene al producto de interés, particularmente en relación a su estructura externa (Asenjo, 1990).

En este capítulo, en la sección 5.2 se presentan los fundamentos de la operación de rompimiento. La sección 5.3 se centra en los equipos de rompimiento que se utilizan a nivel industrial. El diseño de estos equipos se discute en la sección 5.4.

5.2. Fundamentos

La recuperación óptima de productos intracelulares requiere del conocimiento de la estructura de las capas externas que protegen a las células: la membrana y la pared celular. Requiere además del conocimiento de los sistemas que permiten a ciertas células secretar los productos de interés en forma activa, evitando con ésto la necesidad de romper la célula para recuperar el producto.

Existen varios métodos para la recuperación de productos intracelulares, los más drásticos involucran el rompimiento completo de la célula. Los métodos de recuperación menos severos involucran una alteración química de las cubiertas celulares o permeabilización que facilita la salida del producto.

Esta sección se centra en cuatro aspectos fundamentales para el análisis de la operación de rompimiento:

- Estructura de la pared celular.
- Sistemas celulares de secreción.
- Métodos de rompimiento celular.
- Métodos de permeabilización celular.

5.2.1. Estructura de la Pared Celular

En esta sección se describe brevemente la estructura de la pared celular, particularmente la estructura de las paredes bacterianas, debido al relevante papel que tienen las bacterias como la *E. coli* como organismos huésped de varios productos biotecnológicos recombinantes (Wang, 1988).

Las paredes celulares de las bacterias son rígidas y porosas, debido a que las bacterias poseen una elevada presión osmótica interna y frecuentemente pueden hallarse expuestas a diferentes condiciones ambientales externas.

Las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas poseen una característica molecular común (Fig. 5.1): en ambas existe un rígido

esqueleto de peptidoglicano o mureína. La unidad básica que se repite en la estructura del peptidoglicano es la del disacárido constituido por N-acetil-D-glucosamina y el ácido N-acetilmurámico.

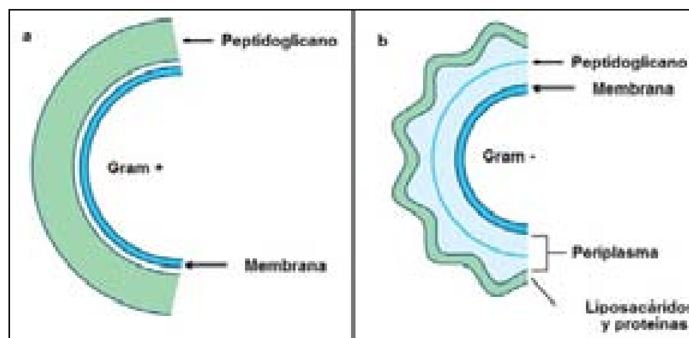


Figura 5.1: Esquema de la estructura externa de bacterias. a) Gram positivas y b) Gram negativas.

En las células Gram positivas la capa de peptidoglicano es mucho más gruesa que en las células Gram negativas. En éstas, la capa de peptidoglicano se encuentra localizada en el espacio periplásmico enlazándose covalentemente a las lipoproteínas de la capa exterior de la pared celular.

El espacio periplásmico está constituido por una sustancia semejante a un gel, que contiene una alta concentración de enzimas degradativas y proteínas de transporte.

La estructura del peptidoglicano de la pared celular bacteriana es resistente a la acción de las enzimas que hidrolizan los péptidos, las cuales no atacan a los péptidos que contienen D-aminoácidos como los que se encuentran en la estructura de la pared (como D-alanina y D-glutamina).

En las células Gram positivas la enzima lisozima se utiliza para el rompimiento celular ya que su mecanismo de acción es el rompimiento de los enlaces glucosídicos del esqueleto polisacárido del peptidoglicano, que en este tipo de células se localizan en la parte externa. Una vez roto el esqueleto de esta manera, la célula se expande con la consecuente ruptura de la membrana y liberación del contenido celular (Lehninger, 1989).

La diferencia en el grosor de la capa de peptidoglicano y su ubicación, permite que las células Gram positivas sean más sensibles a la acción de la lisozima que las Gram negativas. Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas que presentan dificultad al rompimiento por la lisozima, pueden romperse en molinos de perlas de vidrio.

La pared celular de las levaduras consta de dos capas: una capa externa formada de un complejo manano-proteína y una capa interna de glicano.

Cuando es necesario romper completamente la célula recombinante para poder liberar el material intracelular, deben considerarse las características estructurales de la célula para la selección adecuada de la técnica de rompimiento.

5.2.2. Sistemas Celulares de Secreción

Se llama secreción al movimiento de un soluto a través de la membrana celular hacia el exterior de la célula. También se considera como secreción cuando, como en el caso de algunas proteínas, éstas quedan atrapadas en el espacio periplásmico o entre la membrana y la pared celular.

En la producción de proteínas de interés comercial los mecanismos de secreción y la modificación post-traduccional que sufren algunas de estas proteínas en su ruta de secreción, son de gran importancia en el desarrollo de los procesos correspondientes.

Cuando se utiliza *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes se obtienen rendimientos muy altos, sin embargo este tipo de célula presenta dos problemas característicos : a) las proteínas no son secretadas por las células y b) las proteínas no se producen en forma activa, permaneciendo en el protoplasma en forma insoluble formando precipitados llamados cuerpos de inclusión.

Cuando se presentan los problemas mencionados anteriormente, el proceso para la obtención de la proteína de interés debe incluir operaciones de rompimiento celular, reacciones equivalentes a las de modificación post-traduccional "in vivo", y complejas operaciones de recuperación y purificación.

El hecho de que varias de las modificaciones post-traduccionales sean realizadas en las rutas de secreción de las células de mamífero, conjuntamente con la eliminación de la necesidad de una operación de ruptura que ésto implica, ha conducido al empleo de este tipo de células recombinantes para la producción de proteínas. El primer proceso industrial que utiliza células recombinantes de mamífero (células de ovario de hámster), se emplea para la obtención del agente trombolítico llamado "Activador del Plasminógeno Tisular" (t-PA de sus siglas en inglés) (Datar *et al.,* 1993).

La pureza y seguridad de los productos recombinantes es de gran importancia, particularmente en el caso de las proteínas de uso clínico. Los productos de *E. coli* disminuyen el riesgo de transmisión de proteínas carcinogénicas, pero presentan riesgos potenciales de generación de respuestas inmunológicas.

5.2.3. Métodos de Rompimiento Celular

Una gran variedad de métodos de rompimiento celular son usados en el laboratorio (Benov y Al-Ibraheem, 2002), pero sólo algunos de ellos a escala industrial. Los métodos de rompimiento celular (Tabla 5.2) pueden ser divididos en métodos químicos y métodos mecánicos. Dentro de los primeros se encuentran el choque osmótico, la disolución lipídica, la digestión enzimática y el tratamiento alcalino. Dentro de los segundos se encuentran la agitación con abrasivos y la homogeneización.

Métodos químicos

Choque osmótico El rompimiento de células por medio de choque osmótico se fundamenta en el conocimiento del fenómeno de ósmosis. Cuando una mem-

Tabla 5.2: Métodos de rompimiento celular.

Método	Técnica	Principio	Ejemplos
Químicos	Choque osmótico	Ruptura osmótica de membrana	Ruptura de glóbulos rojos
	Disolución lipídica	Desestabilización de la pared celular por solventes org.	Rompimiento de levaduras por tolueno
	Digestión enzimática	Digestión de la pared celular	*M. lysodeikticus* tratados con lisozima
	Tratamiento alcalino	Solubilización de membranas por saponificación de lípidos	Rompimiento de *E. coli* para producción de plásmidos
Mecánicos	Molido en Molinos de Perlas	Las células son prensadas entre perlas de vidrio	Tratamiento de suspensiones celulares a gran escala
	Homogeneización	Las células se rompen por fuerzas de corte al pasar por un orificio pequeño	Tratamiento de suspensiones celulares a gran escala

Adaptada de Scopes, 1994

brana semipermeable separa dos soluciones de diferente concentración de soluto (Fig. 5.2), se produce un movimiento neto de agua a través de la membrana hacia el compartimento que contiene el soluto más concentrado. La presión osmótica es la fuerza que debe aplicarse para contrarrestar la fuerza del flujo osmótico producido.

La presión osmótica es una de las propiedades coligativas de las soluciones; depende del número de partículas de soluto por unidad de volumen pero es independiente de la naturaleza molecular del soluto y de la forma de sus partículas.

El rompimiento celular por choque osmótico consiste en la carga de un volumen dado de células dentro de agua pura (con frecuencia se utiliza el doble del volumen de las células por volumen de agua). La célula se expande debido a que contiene solutos que ocasionan un flujo osmótico del agua hacia su interior. Esta expansión puede conducir a su lisis o rompimiento. La factibilidad del uso de este método depende de la resistencia mecánica de las células de interés.

Se puede desarrollar una expresión para el cálculo de la presión osmótica necesaria para romper una célula a partir de la definición de equilibrio químico. En el equilibrio el potencial químico de las soluciones acuosas es igual en ambos

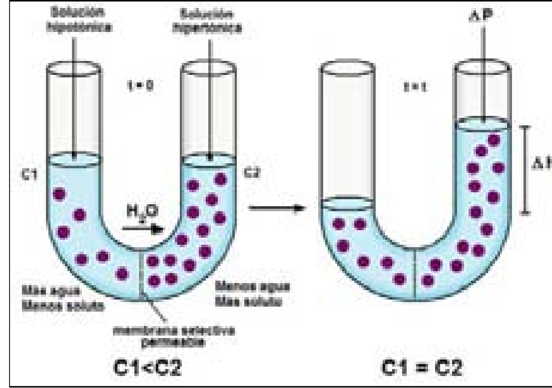


Figura 5.2: Ósmosis y presión osmótica. El fenómeno de ósmosis genera un incremento de altura del líquido en la celda.

lados de la membrana celular, de tal manera que:

$$\mu_{\mathrm{H_2O}}(externo) = \mu_{\mathrm{H_2O}}(interno) \tag{5.1}$$

El potencial químico externo del agua pura debe incluir un valor de referencia y una corrección en la presión. El potencial químico interno involucra un valor de referencia, la corrección en la presión y una corrección para la concentración de la solución; de tal manera que para una solución ideal incompresible, la ecuación (5.1) se expresa como:

$$\mu^0_{\mathrm{H_2O}} + \overline{V}_{H_2O} P_e = \mu^0_{\mathrm{H_2O}} + \overline{V}_{\mathrm{H_2O}} P_i + RT \ln(1 - x_1) \tag{5.2}$$

donde:

$\mu^0_{\mathrm{H_2O}}$: Potencial de referencia. [L−atm/mol].

$\overline{V}_{\mathrm{H_2O}}$: Volumen parcial molar del agua. [L/mol].

x_1: Fracción molar de soluto dentro de la célula.

R: Constante de los gases ideales. [L−atm/mol−°K]

T: Temperatura absoluta. [°K]

Tomando el contenido celular como una solución diluida, el volumen parcial del agua $\overline{V}_{H_2O}$ es aproximadamente igual al volumen molar del agua $\tilde{V}_{H_2O}$, y x_1 es pequeña. De esta manera se tiene:

$$P_e - P_i = \frac{RT}{\overline{V}_{\mathrm{H_2O}}} \ln(1 - x_1) = \frac{RT}{\overline{V}_{\mathrm{H_2O}}}(-x_1 - ...)$$

y finalmente:

$$P_e - P_i = -RTc_1 \tag{5.3}$$

Esta relación es llamada ley de van't Hoff y en ella c_1 es la concentración del soluto 1.

El rompimiento por ósmosis es relativamente simple, no requiere un equipo sofisticado ni de temperaturas elelvadas. Es efectivo para el rompimiento de células animales. Sin embargo, es difícil de aplicar en algunos microorganismos.

Solubilización de membranas por saponificación Este método de lisis consiste en la solubilización de la membrana celular a un pH alto con un agente alcalino, (*v.g.* hidróxido de sodio, NaOH) en presencia de un detergente (*v.g.* dodecil sulfato de sodio, SDS). El papel del detergente es solubilizar la membrana celular, eliminando las interacciones interfaciales no covalentes entre proteínas y lípidos, lo que provoca la liberación de todos los componentes intracelulares y además promueve la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos. Este método ha sido usado recientemente en la producción a escala de plásmidos para uso médico, debido a que los esfuerzos cortantes que se presentan con otros métodos de rompimiento dañan el plásmido.

Disolución lipídica La extracción por solventes ha sido usada para la disolución selectiva de ciertos componentes celulares. Un gran número de solventes orgánicos han sido investigados en el laboratorio para ser utilizados con este fin, sin embargo su uso es limitado debido a que pueden inhibir severamente las actividades biológicas.

La técnica de disolución lipídica es relativamente simple, típicamente se añade a la suspensión celular un volumen de tolueno aproximadamente igual al 10 % de la biomasa. El tolueno es absorbido dentro de los lípidos de la pared celular, lo que produce la expansión de la pared y la ruptura de ésta. El contenido celular es liberado y entonces puede ser separado el producto de interés.

Otros tipos de solventes además del tolueno también son efectivos para este propósito. El benceno es efectivo pero es carcinogénico y altamente volátil. El tolueno también es carcinogénico pero es menos volátil. El uso de estos compuestos requiere considerar las normas de las agencias reguladoras.

Para la aplicación de la técnica de disolución lipídica se requiere hacer con anticipación un buen número de experimentos de laboratorio, para verificar los parámetros de solubilidad que reflejen las interacciones lípido-solvente. En la práctica los solventes con similares parámetros de solubilidad atacarán a las células en forma similar.

Idealmente se deben seleccionar solventes cuyos parámetros de solubilidad sean apropiados para los lípidos de la pared celular pero inadecuados para disolver al producto de interés localizado dentro de la célula. Esto casi nunca se conoce entonces es necesario realizar experimentos.

Digestión enzimática La digestión enzimática consiste en el empleo de enzimas que atacan la pared y provocan el rompimiento celular. Una de las enzimas más utilizada en la digestión enzimática de bacterias es la lisozima. Esta enzima rompe el enlace β 1-4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil glucosamina de la capa de peptidoglicano de la pared celular, provocando el rompimiento de la pared y consecuentemente la ruptura de la célula.

A pH's menores de 5 las células no se rompen aun cuando la pared celular haya sido destruida por digestión. Esto se debe a la baja solubilidad del protoplasma a estos pH's y enfatiza la necesidad tanto de rompimiento de la pared celular, como de condiciones favorables de solubilidad para una liberación eficiente de los materiales intracelulares (Edebo, 1969).

El alto costo de las enzimas no permite que esta técnica sea usada ampliamente en el rompimiento celular a nivel industrial a pesar de ser altamente selectiva (Andrews *et al.,* 1990).

Métodos mecánicos

En el rompimiento de células a gran escala se han preferido los métodos mecánicos. Las técnicas empleadas son: la molienda húmeda en molinos de perlas agitados a alta velocidad (esfuerzo de corte sólido) y la homogeneización a alta presión (esfuerzo de corte líquido) (Bjustrom, 1985; Kula y Schütte, 1987).

El equipo que se utiliza en estas técnicas originalmente fue diseñado para otros usos. El uso del molino de perlas se originó en la industria de la pintura por la necesidad de obtener mezclas homogéneas de los pigmentos constituyentes de la pintura. El uso del homogeneizador se originó en la industria alimenticia, particularmente en la homogeneización de leche y productos lácteos (obviamente la ruptura celular no es una homogeneización). Estos equipos han sido adaptados para utilizarse en la desintegración celular.

La desintegración celular no es una tarea fácil si se considera la alta resistencia mecánica de las paredes celulares y el tamaño tan pequeño de los microorganismos ($1-10$ μm). Para poder alcanzar rendimientos altos, esto es, obtener un grado de desintegración celular mayor que 90 %, con frecuencia se requieren dos o tres pasos tanto en el homogeneizador como en el molino.

El paso repetido de la suspensión celular a través de los equipos de rompimiento produce una distribución amplia del tamaño de los residuos de la pared celular, extendiéndose hasta por abajo de las 0.3 μm. En esta operación es importante controlar el tamaño de los desechos celulares debido a que la separación sólido-líquido posterior depende del tamaño de las partículas.

5.2.4. Métodos de Permeabilización

Los métodos de permeabilización (Fig. 5.3) consisten en alterar la estructura de la pared y la membrana celular para facilitar la difusión del producto hacia el exterior de la célula. Debido a los problemas asociados con la purificación de productos obtenidos por rompimiento celular, existe un gran interés en el

empleo de estos métodos alternativos a la ruptura mecánica empleada a nivel industrial (Danilevich *et al.,* 2008).

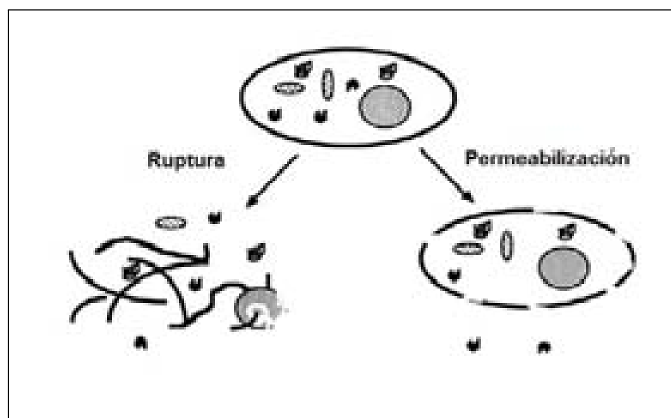


Figura 5.3: Comparación conceptual de permeabilización (lado derecho) y rompimiento mecánico (lado izquierdo) Fuente: Naglak *et al.*, 1990.

Existen diversos métodos para realizar la permeabilización celular, varios de los cuales son iguales a los empleados en el rompimiento celular pero se realizan a condiciones más leves. Por ejemplo, mediante presión osmótica controlada es posible liberar proteínas localizadas en el espacio periplásmico de células Gram negativas.

Varios de los trabajos sobre permeabilización han sido desarrollados en bacterias Gram negativas, principalmente *E. coli*, usando solventes como tolueno al 5 %, detergentes aniónicos y no iónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y Tritón X-100, agentes caotrópicos como guanidina y úrea, y agentes quelantes como el EDTA (Naglak *et al.,* 1990).

La base de una solubilización efectiva radica en la estructura química del detergente o agente solubilizante (Fig. 5.4). Estas estructuras tienen una porción hidrofílica (generalmente iónica) y una parte hidrofóbica (generalmente un radical orgánico). Como resultado de lo anterior, todos los detergentes son anfipáticos, capaces de interaccionar tanto con el agua como con un lípido, esto permite que sean empleados para solubilizar la pared de las bacterias Gram negativas.

La naturaleza anfipática se mantiene si los detergentes son aniónicos, catiónicos o no iónicos. Dentro de los materiales aniónicos se encuentran los jabones los cuales son sales de los ácidos grasos. Debido a que los jabones presentan un grupo carboxílico sólo son detergentes efectivos a pH altos, donde este grupo permanece ionizado (los jabones no son efectivos en aguas duras, donde los iones de calcio pueden reaccionar con ellos para formar precipitados insolubles). La desventaja de los jabones convencionales como permeabilizantes, puede ser evi-

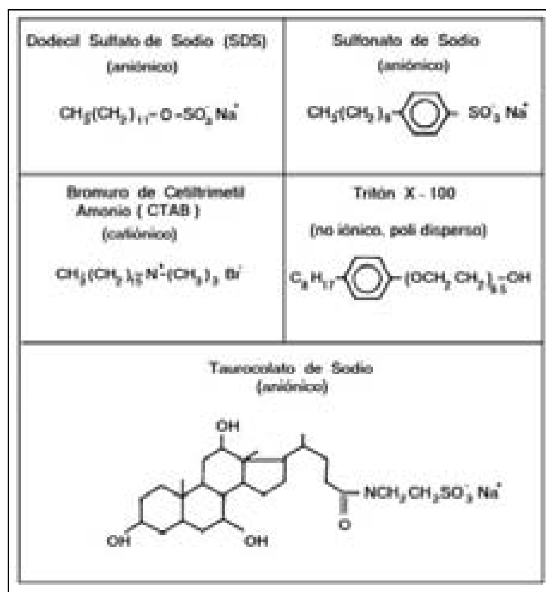


Figura 5.4: Estructuras químicas de agentes solubilizadores. Fuente: Belter *et al.*, 1988.

tada reemplazando el grupo carboxílico con un grupo sulfato. El sulfato puede estar ligado a un anillo bencénico formando un sulfonato semejante al que se muestra en la Figura 5.4. Este sulfonato es más efectivo que los sulfatos alcalinos en la ruptura de células; por esta misma razón los sulfonatos no son fácilmente degradados microbiológicamente.

Los detergentes no iónicos comerciales como el Tritón X-100 están menos definidos químicamente. Las moléculas de este detergente tienen también una porción hidrofóbica y una hidrofílica. La parte hidrofílica no es un sulfato sino un alcohol. El aspecto importante de estos detergentes es su habilidad para solubilizar lípidos de la pared celular y de esta manera modificar la estructura de la célula.

En soluciones muy diluidas de detergentes, casi no hay disolución de lípidos. Existe una concentración a la cual los lípidos repentinamente comienzan a solubilizarse; arriba de esta concentración la solubilidad de los lípidos varía linealmente con la concentración de detergente como se muestra en la Figura 5.5.

Permeabilizando la célula de *E. coli* con guanidina y Tritón X-100, en concentraciones de 0.1 M de guanidina y 0.5 % de Tritón, se libera cerca del 50 % de la proteína intracelular (Naglak *et al.,* 1990).

La proteína recombinante β - lactamasa ha sido recuperada con toda su actividad (de *E. coli*) utilizando una solución 0.2 M de guanidina. Se ha encontrado que con la permeabilización con guanidina a concentraciones de 6.0 M, algunas

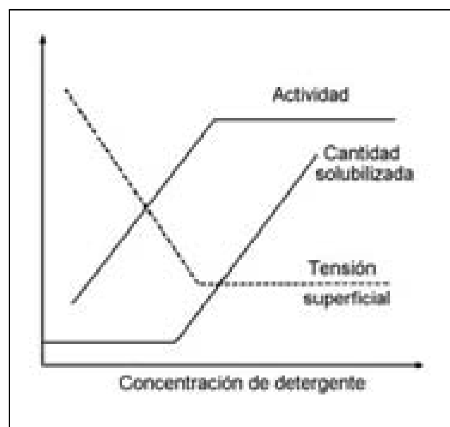


Figura 5.5: Efecto de la concentración de detergentes sobre la disolución de lípidos. Fuente: Belter *et al.*, 1988. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons.

proteínas como las que se encuentran en cuerpos de inclusión, conservan toda o parte de su actividad biológica. Por esta razón, este método de permeabilización celular puede ser muy apropiado para algunos productos recombinantes.

Recientemente, los surfactantes anfipáticos de origen biológico conocidos como biosurfactantes, también están siendo utilizados como permeabilizantes, debido a que son más biodegradables y amigables al ambiente (Zaragoza *et al.*, 2009).

Debido a que la permeabilización puede ser llevada a cabo en un simple recipiente agitado, sus costos de operación y de inversión son más bajos que los de los métodos de rompimiento celular mecánicos. La principal desventaja de la permeabilización con respecto a los métodos mecánicos y a la lisis enzimática, es que libera menos proteína por unidad de tiempo.

5.3. Equipo de Rompimiento Celular

La operación de rompimiento celular a nivel industrial actualmente se realiza en tres tipos de equipos de rompimiento mecánico:

- Molinos de Perlas de Alta Velocidad.
- Homogeneizadores de Alta Presión.
- Microfluidizadores.

5.3.1. Molino de Perlas de Alta Velocidad

Los molinos de perlas de alta velocidad (Fig. 5.6a) constan fundamentalmente de un cilindro en posición horizontal (o vertical) llamado cámara de molienda, un agitador que consiste de una flecha giratoria sobre la que se monta un sistema de discos, barras o anillos que provoca el movimiento del contenido del molino (Fig. 5.7), y una gran cantidad de pequeñas perlas de vidrio que son los elementos activos de molienda. Estos molinos son utilizados a nivel industrial para la desintegración de bacterias, levaduras, algas y hongos microscópicos (Heim *et al.*, 2007).

Estos molinos alcanzan una alta eficiencia de molienda, trabajan a baja presión, pueden manejar suspensiones concentradas, operan en forma continua o por lotes y requieren poco mantenimiento. El eventual rompimiento de las perlas es un aspecto que debe ser considerado en la selección de estos equipos.

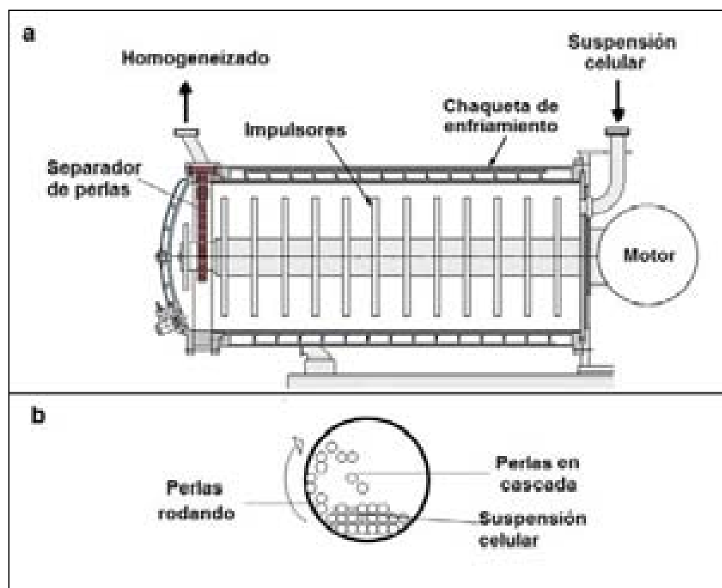


Figura 5.6: Molino de perlas. a) Esquema de un arreglo típico y b) Mecanismos de ruptura.

La suspensión celular se introduce por uno de los extremos de la cámara de molienda. El agitador produce el movimiento necesario de la masa celular y las perlas de vidrio. Los discos presentan perforaciones cubiertas con membranas que permiten el paso del material celular pero no así el de las perlas. Los discos o impulsores pueden montarse sobre la flecha ya sea en forma concéntrica o excéntrica.

El tipo de agitador está directamente relacionado con el transporte de energía óptimo de las partes en rotación a las perlas de vidrio. El tipo de flechas e im-

pulsores que se utilicen depende de la aplicación concreta que se le dará al molino.

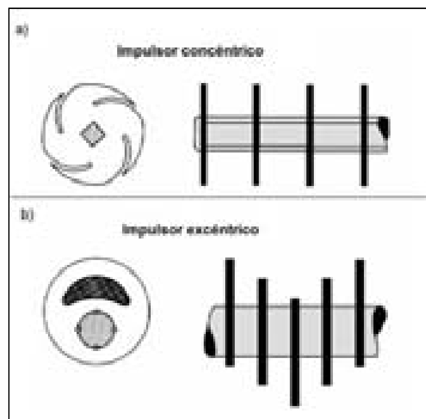


Figura 5.7: Diferentes arreglos de impulsores. a) Concéntrico y b) Excéntrico. Fuente: Kula y Schütte, 1987. Reproducida con el permiso del American Institute of Chemical Engineers. Copyright ©1987 AIChE. Todos los derechos reservados.

Los molinos de perlas agitados a alta velocidad que se encuentran disponibles en el mercado, difieren en la relación de longitud a diámetro de la cámara de molienda. La relación óptima se encuentra entre 1 : 2.5 y 1 : 3.5. Los volúmenes varían entre 50 mL y 250 L para equipos de laboratorio, planta piloto y producción a escala industrial. Estos últimos permiten manejar flujos de hasta 2,000 L/h.

Mecanismo de desintegración celular

El transporte de energía cinética desde el agitador a las perlas de vidrio se efectúa por fuerzas de adherencia en combinación con fuerzas de desplazamiento. Ambas relacionadas con el diseño geométrico, y con las propiedades de la superficie y del impulsor. El volumen de la cámara de molienda se activa a través de la aceleración de las perlas en dirección radial formando capas de corriente de diferente velocidad. Los perfiles de velocidad diferencial generan considerables fuerzas de corte dependiendo de la velocidad y el tamaño de las perlas de vidrio. Las fuerzas de corte generadas, conjuntamente con la frecuencia y la fuerza de las colisiones entre las perlas, son la causa de la desintegración de las células (Fig. 5.6b).

Parámetros operacionales

El molino de perlas está caracterizado por un gran número de parámetros operacionales (Kula y Schütte, 1987). Los más importantes para la desinte-

gración celular se muestran en la Tabla 5.3 y algunos de ellos son discutidos a continuación.

Tabla 5.3: Principales parámetros operacionales del molino de perlas agitado.

Parámetros Operacionales	
–	Velocidad del agitador
–	Velocidad de alimentación de la suspensión celular
–	Diseño del agitador
–	Tamaño de las perlas de vidrio
–	Carga de las perlas de vidrio
–	Concentración celular
–	Temperatura

Adaptada de: Kula y Schütte, 1987

Velocidad del agitador El agitador es responsable de la transferencia de energía y de la activación de las perlas en la cámara de molienda. La velocidad periférica normalizada de los anillos se utiliza para comparar molinos diferentes, debido a que proporciona mayor información técnica al agrupar varios parámetros relacionados con la velocidad de agitación.

Para impulsores montados excéntricamente, se toma un promedio de velocidades periféricas $\overline{U}$ (m/s) el cual es calculado de acuerdo a la ecuación:

$$\overline{U} = \frac{\pi D_m N}{60 \times 1000} \quad [=] \ \frac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}} \tag{5.4}$$

con:

$$D_m = 2\sqrt{e^2 + \frac{d^2}{4}}$$

donde:

D_m: Diámetro promedio de los anillos excéntricos. [mm].

e: Diámetro de la flecha del agitador. [mm].

d: Diámetro de los anillos del agitador. [mm].

N: Velocidad angular del agitador. [rpm].

Para el caso de impulsores concéntricos, en la ecuación (5.4) se utiliza directamente el diámetro del impulsor.

Normalmente la velocidad periférica fluctúa entre 5 y 15 m/s. Al incrementar la velocidad periférica la fuerza de corte generada se incrementa, y con ésta

la frecuencia de colisión. Paralelamente, la temperatura se incrementará dependiendo de la carga de perlas la cámara de molienda. La erosión de las perlas también se incrementará y con esto, la energía necesaria para manejar el agitador.

La Figura 5.8a muestra el efecto de la velocidad del agitador sobre la desintegración de *S. cerevisiae* en un molino de perlas agitado de 4.0 L. Se puede observar que a una velocidad periférica de 8 m/s (1500 rpm) se obtiene la velocidad óptima para la desintegración celular (velocidades mayores producen sólo más calentamiento). En microorganismos pequeños como las bacterias, la velocidad periférica óptima para este tipo de molino se encuentra alrededor de 10 m/s (1900 rpm).

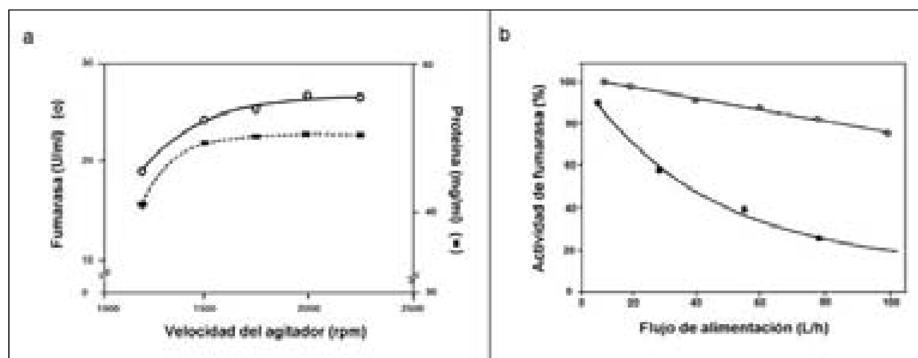


Figura 5.8: Molino de perlas. a) Efecto de la velocidad del agitador sobre la liberación de enzima y proteína intracelular en *S. cerevisiae*. Netzsch LME4. b) Efecto del flujo de la alimentación sobre la liberación de fumarasa en *S. cerevisiae* (o) y *B. ammoniagenes* (•). Fuente: Kula y Schütte, 1987.

Para un flujo de alimentación constante, no existe una relación lineal entre el grado de desintegración celular y la velocidad periférica, lo cual puede ser atribuido a los cambios en la distribución del tiempo de residencia con la variación de la velocidad de agitación.

Flujo de alimentación de la suspensión celular El flujo permisible en un molino de perlas es función del volumen del molino, de la carga de perlas y de la velocidad del agitador. El molino Netzsch LME4 (Netzsch-Feinmahltechnik GmbH, Selb, F.R.G) cuyo volumen es de 4 L, puede ser operado con flujos de alimentación mayores de 100 L/h.

El consumo de potencia del molino depende en primer lugar de la velocidad del agitador y sólo ligeramente del flujo de alimentación. Por lo tanto, los flujos de alimentación altos pueden ser más económicos.

En teoría el grado de desintegración celular alcanzado por paso, es inversamente proporcional al flujo de alimentación. Para levaduras sin embargo, esto no se cumple. La Figura 5.8b muestra la poca influencia del flujo de alimentación sobre el grado de desintegración de *S. cerevisiae*. Un incremento de un orden de magnitud en el flujo de alimentación, desde 10 a 100 L/h produce un decremento en el grado de desintegración del microorganismo de solamente 20 %. Por otra parte, la liberación de enzima intracelular a partir de *Brevibacterium ammoniagenes* disminuye en forma más marcada con el incremento en el flujo de alimentación (esto se debe principalmente a la diferencia de tamaño y a la mayor resistencia de la pared de las bacterias Gram positivas).

Considerando los tiempos de residencia y la demanda de energía, es aconsejable operar los molinos de perlas a altos flujos de alimentación y utilizar varios pasos para alcanzar el rendimiento requerido.

Diseño del agitador y efectos del mezclado El comportamiento de un molino de perlas depende en gran medida del patrón de flujo y mezclado que produce el agitador. El patrón se sitúa entre el flujo ideal tipo tapón (sin mezclado) y el tipo tanque continuo completamente agitado (100 % agitado). El comportamiento de mezclado en un molino de perlas puede ser determinado mediante técnicas con trazadores (tintas, sales, etc.) que permiten establecer la distribución de tiempos de residencia de los elementos del fluido en el molino (Levenspiel, 1972).

El rompimiento celular es función de la velocidad del agitador y del flujo de alimentación de la suspensión. Esta funcionalidad es lineal sólo si los microorganismos son transportados como flujo tapón (sin mezclado axial), lo que significa idénticas velocidades de transporte axiales a través de la cámara de molienda. Sin embargo, en los agitadores de los molinos comerciales se presentan efectos que provocan el mezclado de todas las partículas introducidas en la cámara. Ocasionalmente, un microorganismo a la entrada de la cámara que tiene un tiempo de residencia igual a cero, tendrá la misma probabilidad de dejar la cámara de molienda que un microorganismo que haya entrado en ella previamente.

Tiempo de residencia La Figura 5.9 muestra la distribución de tiempos de residencia en un molino Netzsche LME 20 en respuesta a un pulso de colorante, usando tres tipos diferentes agitadores con la misma cámara. La distribución de la concentración de tinta en la corriente de salida puede ser correlacionada directamente con la distribución normalizada de tiempos de residencia. En general se requieren cuatro o cinco tiempos de residencia ideales para cambiar completamente el contenido de la cámara de molienda.

Puesto que la célula está presente en la cámara de molienda con una probabilidad y periodos de tiempo diferentes, el tiempo de residencia promedio $\bar{t}$, no es idéntico al tiempo de residencia ideal t_R.

Con los tres tipos de agitadores a que se refiere la Figura 5.9 se ha observado que un incremento en la velocidad de rotación produce una distribución más am-

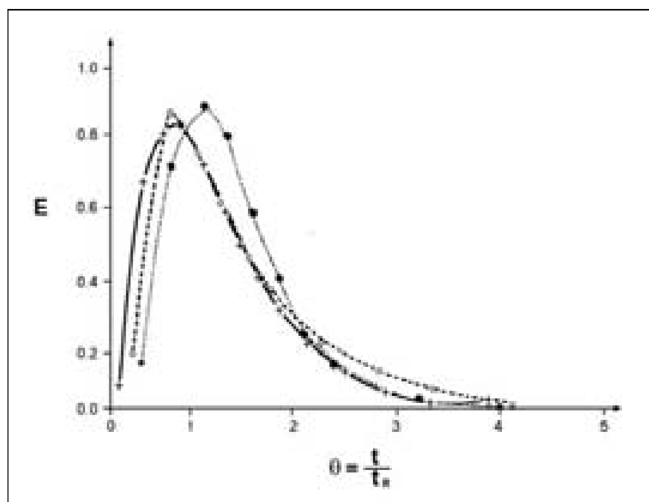


Figura 5.9: Efecto de la geometría del tipo de agitador sobre el tiempo de residencia, a un flujo de alimentación de 180 L/h. (+) de postes, (o) de discos excéntricos y (•) de discos dobles. Fuente: Kula y Schütte, 1987. Reproducida con el permiso del American Institute of Chemical Engineers. Copyright ©1987 AIChE. Todos los derechos reservados.

plia de tiempos de residencia. Se ha observado también que un incremento en la velocidad de alimentación produce una distribución más estrecha de tiempos de residencia con los tres tipos de agitadores. Esto permite incrementar la eficiencia de los molinos y explica por qué la velocidad de alimentación aparentemente no afecta considerablemente el grado de desintegración alcanzado en un solo paso.

Tamaño de las perlas de vidrio En la desintegración celular se utilizan perlas de vidrio libres de plomo con un diámetro entre 0.2 y 1.5 mm. En molinos de laboratorio pueden utilizarse perlas hasta de 0.2 mm de diámetro. Sin embargo, a escala industrial el tamaño de las perlas debe ser mayor a 0.4 mm para facilitar su separación continua.

Algunas observaciones experimentales indican que el tamaño óptimo de las perlas depende del tipo de célula. Para levaduras se requieren diámetros mayores a 0.5 mm y para bacterias menores que 0.5 mm. Las enzimas localizadas en el espacio periplásmico son más fácilmente liberadas utilizando perlas de vidrio mayores en relación a las utilizadas para liberar enzimas protoplasmáticas (Keshavarz *et al.,* 1987).

Existe un diámetro óptimo para las perlas. Dada una relación de volumen del molino a volumen de perlas, el número de perlas aumenta al disminuir el diámetro de éstas. Esto aumenta la frecuencia de las colisiones entre las perlas y por lo tanto la eficiencia de la ruptura. Por otro lado, al disminuir el diámetro

de las perlas aumenta su tendencia a flotar produciendo el efecto contrario.

Carga de perlas La cantidad de perlas que debe ser cargada al molino depende del tipo de células y del tamaño de las perlas. Una carga baja de perlas produce una eficiencia baja, mientras que una carga alta genera mayor consumo de potencia y libera más calor.

Empíricamente se ha determinado que la carga óptima de un molino fluctúa entre el 80 y 90 %. La carga recomendada para perlas de 0.5 mm y 1.0 mm es de 85 % y 80 %, respectivamente.

La expresión para calcular la carga de perlas de un molino es la siguiente:

$$\text{Carga} = \frac{V_p}{V_c} \tag{5.5}$$

donde:

V_p: Volumen del lecho de perlas. $[L^3]$.

$V_c = V_t - V_a$: Volumen vacío del molino sin perlas.

V_t: Volumen de la cámara de molienda. $[L^3]$.

V_a: Volumen del agitador (discos o barras y flecha). $[L^3]$.

Ejemplo 5.1. Carga de un molino de perlas.

El lecho formado por las perlas de un molino tiene una porosidad de 0.375. Estimar la fracción de volumen vacío de la cámara del molino (V_M) cuando la carga es del 80 %.

Solución:

De acuerdo con la ecuación (5.5),

$$0.8 = \frac{V_p}{V_c}$$

la fracción vacía está dada por:

$$\text{Fracción} = \frac{(V_p)(0.375) + 0.2V_c}{V_c}$$

combinando las expresiones anteriores,

$$\text{Fracción} = \frac{(0.8V_c)(0.375) + 0.2V_c}{V_c} = 0.5$$

Cuando la carga de perlas es del 80 %, el volumen de todas las perlas es igual al volumen libre total en la cámara V_M.

Concentración de la suspensión celular La concentración de células en la suspensión no afecta considerablemente la efectividad de la desintegración celular. Se ha reportado un grado de desintegración idéntico para células de levadura en concentraciones de 4 a 20 % de peso seco de células, en un molino Dyno KD5. La generación de calor disminuye con el decremento de la concentración celular mientras que el consumo de energía por unidad de peso se incrementa. El peso húmedo de células óptimo para la desintegración celular en un molino de perlas agitado se encuentra entre el 40 y 50 %.

Efecto de la temperatura La temperatura de molienda facilita el rompimiento celular pero puede afectar al producto. En general el rompimiento celular se realiza a una temperatura de entre 5 y 15 °C. Es dificil llevar un control preciso de la temperatura puesto que una gran parte de la energía introducida por el agitador dentro de la mezcla es transformada en calor. Por ejemplo, en un molino Netzsch LME20 que consume una potencia de 7.5 Kwh aproximadamente cerca de 6,000 kcal/h tienen que ser removidas por el sistema de enfriamiento.

5.3.2. Homogeneizador de Alta Presión

Los homogeneizadores de alta presión son los equipos más ampliamente utilizados para el rompimiento celular a gran escala (Keshavarz *et al.,* 1987). El homogeneizador de más amplio uso es el Manton-Gaulin, sin embargo existen otros tipos de homogeneizadores como el Microfluidizador.

Un homogeneizador de alta presión del tipo Manton-Gaulin consta de dos partes principales: una bomba de pistón de alta presión y una válvula. El número de pistones de la bomba depende del tamaño del homogeneizador, en los equipos de laboratorio las bombas constan de uno o dos pistones, mientras que las de los equipos industriales tienen de tres a cinco.

Durante una operación normal, se utiliza una bomba de alimentación que opera a una presión entre 0.1 y 0.5 MPa (millones de Pascales) para transportar la suspensión celular a la bomba de alta presión, donde la suspensión es comprimida hasta 60 MPa. La válvula acoplada a la bomba (Fig. 5.10), se abre cuando la presión excede un valor determinado. La suspensión de células es liberada a través de la válvula con una velocidad muy alta, y después de cambiar de dirección choca contra un anillo de impacto.

Los homogeneizadores de alta presión presentan eficiencias de rompimiento muy altas, trabajan con suspensiones de concentración intermedia, son escalables, operan continuamente y permiten manejar altos volúmenes de trabajo. Estos equipos por sus altas presiones de operación requieren especial atención de los sellos de las partes móviles.

Mecanismo de desintegración celular

La desintegración celular se inicia cuando la suspensión celular pasa a alta presión por la válvula, donde las células se someten a turbulencia, cavitación y esfuerzos de corte líquido. De acuerdo a los resultados experimentales que han

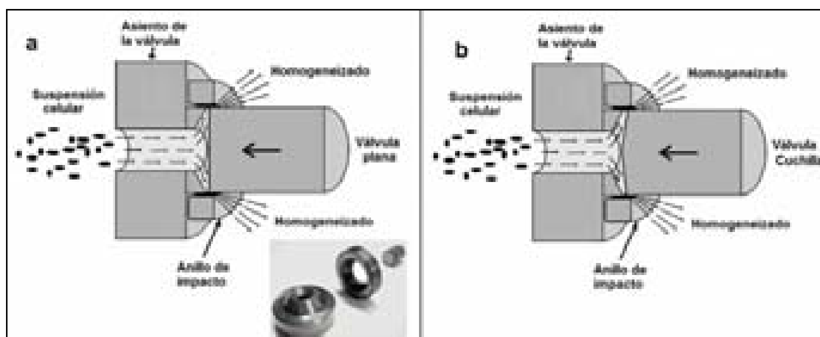


Figura 5.10: Configuración de las válvulas usadas en el homogeneizador: a) Válvula plana y b) Válvula de cuchilla. Fuente: Kula y Schütte, 1987. Reproducida con el permiso del American Institute of Chemical Engineers.

sido reportados, parece razonable suponer que en el homogeneizador de Gaulin, la fuerza del choque sobre el anillo es directamente proporcional a la presión de operación y es la causa principal del rompimiento (Kelly y Muske, 2004; Kula y Schütte, 1987).

El método de rompimiento por homogeneización no es selectivo. No existe forma de diferenciar entre la liberación de proteínas del espacio periplásmico y las protoplasmáticas, por lo que no es recomendable como rompimiento selectivo.

La homogeneización no es efectiva para la desintegración de algunas bacterias Gram positivas que presentan una pared celular muy gruesa y aparentemente no pueden ser desintegradas en el homogeneizador de alta presión, al menos a presiones hasta de 55 MPa. Sin embargo, se ha realizado con éxito el rompimiento de levaduras y de bacterias Gram negativas como la *Alcaligenes eutrophus* (Harrison *et al.,* 1990).

Parámetros operacionales

En la Tabla 5.4 se presentan los parámetros operacionales que tienen influencia en el rompimiento celular en el homogeneizador de alta presión (Kula y Schütte, 1987). Como puede observarse el número de parámetros es menor que los correspondientes al molino de perlas lo que facilita la optimización de este tipo de procesos.

Presión de operación Para lograr un rompimiento eficiente de células la presión de operación del homogeneizador debe ser alta (Ramanan, 2009), superior a 35 MPa (la industria alimenticia opera sus homogeneizadores a una presión de 35 MPa). En la Figura 5.11a se muestra como varía la liberación de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa de *S. cerevisiae,* con la presión de operación

Tabla 5.4: Principales parámetros de operación del homogeneizador de alta presión.

Parámetros operacionales
– Presión de operación
– Diseño de la válvula
– Concentración celular
– Temperatura

Adaptada de: Kula y Schütte, 1987

en un solo paso. Se puede observar que a 55 MPa hay tres veces más enzima en la fracción libre de células, que a 30 MPa. Sin embargo, la enzima liberada en un solo paso representa solamente cerca del 45 % de la cantidad total presente en la suspensión.

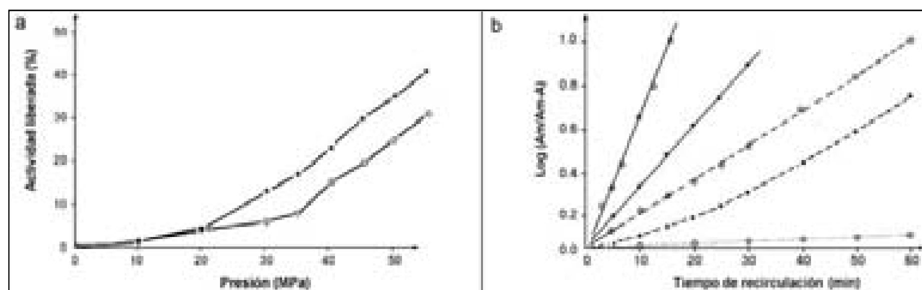


Figura 5.11: Rompimiento de *S. cerevisiae* con homogeneizador a alta presión a) Efecto del tipo de cuchilla utilizado sobre la liberación de glucosa-6-fosfato hidrogenasa con diferentes válvulas. (+) cuchilla y (o) plana. b) Efecto del tiempo de recirculación sobre la liberación de enzima. Válvulas de (o) cuchilla (+) plana. Presión (—) 55 MPa, (- - -) 30 MPa y (.....) 15 MPa). Fuente: Kula y Schütte, 1987.

La presión de operación del homogeneizador depende del producto que se desee liberar. Durante una operación se empieza a observar liberación de proteína soluble a presiones mayores que 10 MPa, sin embargo para liberar DNA se requieren presiones por arriba de 25 MPa. En general las presiones de operación más usadas son de 55 MPa.

Diseño de la válvula En la Figura 5.10 se muestran las configuraciones de las válvulas que se usan con más frecuencia en los homogeneizadores: la unidad

plana y la unidad de cuchilla. En la Figura 5.11a se muestra el comportamiento de los dos tipos de válvulas en el rompimiento celular como una función de la presión de operación, se puede observar que por arriba de una presión de 20 MPa la válvula de cuchilla libera mayor cantidad de enzima que la válvula plana, por abajo de esta presión la cantidad de enzima liberada es aproximadamente igual para ambos tipos de válvulas.

En la Figura 5.11b se presenta el comportamiento de la liberación de una enzima en función del tiempo de recirculación a tres diferentes presiones y para dos tipos de válvula, se puede observar que la cantidad de enzima liberada aumenta con la presión, y para una presión dada el incremento es mayor si se utiliza una válvula de cuchilla.

Concentración de la suspensión celular y temperatura La desintegración celular es independiente de la concentración de células de levaduras en concentraciones entre 100 y 600 gramos de peso seco por litro.

Durante la homogeneización la temperatura de la suspensión celular es un parámetro que no se mantiene constante y por lo tanto es difícil correlacionarlo. La constante específica de la velocidad de homogeneización varía directamente con la temperatura hasta un valor de 30 °C. Se han observado diferencias de alrededor de 40 % en este parámetro en el rango de 5 a 30 °C. Aún así, se requieren tres pasos a una presión máxima de 55 MPa y a 30 °C para alcanzar una desintegración celular mayor del 90 %.

5.3.3. Microfluidizador

El microfluidizador es un homogeneizador de alta presión que tiene un mecanismo de rompimiento celular diferente al del homogeneizador Manton-Gaulin. Su mecanismo de rompimiento utiliza una bomba de alta presión manejada con aire y una cámara especial de rompimiento conectada a un dispositivo de contrapresión, como se muestra en la Figura 5.12.

La suspensión celular se divide en dos corrientes haciéndola pasar a presión a través de dos microcanales de sección transversal de 2×100 μm. Seguidamente las corrientes son impactadas a alta velocidad y mezcladas en una pared estacionaria de la cámara de rompimiento. Mediante este mecanismo la energía de entrada se disipa casi instantáneamente produciéndose la ruptura celular.

Los límites de operación del microfluidizador están dados por: la presión de aire requerida para manejar la bomba, las propiedades fisicoquímicas del líquido bombeado y la presión máxima de trabajo permitida que es de 140 MPa.

Alguna ventajas que presenta el microfluidizador en comparación con el homogeneizador Manton-Gaulin (Sauer *et al.,* 1989) son las siguientes:

a) Es muy compacto, se puede montar sobre una charola de acero inoxidable de 30×35 cm.

b) Permite un mayor enfriamiento del sistema: Adicionalmente a los serpentines de enfriamiento que también presenta el Manton-Gaulin, la cámara de rompimiento puede colocarse en un baño de hielo.

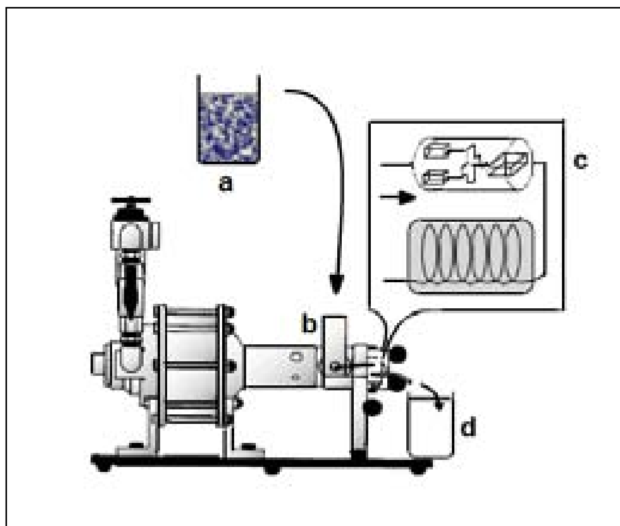


Figura 5.12: Diagrama del Microfluidizador. a) Suspensión, b) Tanque receptor, c) Cámara de rompimiento e intercambiador de calor y d) Homogeneizado. Fuente: Sauer *et al.*, 1989.

c) Puede alcanzarse un rompimiento celular más eficiente (en el caso de bacterias).

d) Permite flujos más bajos ($2-23$ L/h con presiones de operación de $10-95$ MPa) y maneja volúmenes menores (30 mL), lo que lo hace compatible con operaciones de flujo continuo.

e) Es relativamente fácil de operar.

Parámetros operacionales

A continuación se describe el efecto de la temperatura, del tamaño de los restos celulares y de la concentración celular en el proceso de ruptura utilizando un microfluidizador.

Temperatura de operación Generalmente cuando se trabaja con presiones altas es necesario enfriar el sistema. Si el homogeneizador no tiene un sistema de enfriamiento eficiente de la cámara de rompimiento, puede presentarse un incremento hasta de 80 °C en la temperatura de la suspensión celular, lo cual puede ocasionar la desnaturalización de la proteína de interés.

El microfluidizador permite mantener incrementos de temperatura menores a 20 °C en la cámara de rompimiento, que es la parte de mayor temperatura. Por otro lado, el tiempo durante el cual las células están expuestas a temperaturas elevadas es muy corto, dado que el tiempo de residencia de las células en la

cámara de rompimiento es de 0.025 a 0.04 segundos. Ambos efectos contribuyen a incrementar la eficiencia de la operación.

En estudios sobre el rompimiento de células de *E. coli* (Agerkvist y Enfors 1990), se enfrió la cámara de rompimiento por inmersión en un baño de agua helada para proporcionar enfriamiento adicional al proporcionado por el serpentín del equipo. La suspensión celular se alimentó a una presión de 60 MPa y a un flujo de 18 L/h. La temperatura de la suspensión a la entrada varió entre 8 *y* 10 °C. Después del primer paso la temperatura a la salida fue aproximadamente de 23 °C, de cerca de 27 °C después del segundo y aproximadamente de 28 °C después de tres pasos.

Tamaño de los restos celulares El microfluidizador produce restos celulares de mayor tamaño que los producidos en el homogeneizador Manton-Gaulin, generándose suspensiones de menor viscosidad. Ambos efectos facilitan la separación de los restos celulares durante la centrifugación. Este efecto disminuye al aumentar el número de pasos (Agerkvist y Enfors, 1990).

Concentración celular En investigaciones realizadas con *E. coli* (Sauer *et al.,* 1989), se encontró que el microfluidizador puede romper células que se encuentran en soluciones cuyas concentraciones varían de 5.6 a 174 gramos de peso seco por litro.

El hecho de que en el microfluidizador puedan manejarse concentraciones hasta de 5.6 gramos de peso seco por litro tiene implicaciones en el diseño óptimo del proceso de bioseparación, dado que es posible pasar el caldo del fermentador directamente al microfluidizador para efectuar la ruptura celular. De esta manera puede eliminarse la operación de cosecha de células, o disminuir el grado de concentración necesario previo a la ruptura. El costo del proceso en forma integral puede ser menor aún cuando las etapas de concentración y purificación posteriores a la ruptura también se vean modificadas.

5.4. Diseño de Equipo de Rompimiento

En esta sección se presentan los principios de diseño de los dos tipos de equipos más empleados en el rompimiento celular a nivel industrial:

- Molino de Perlas de Alta Velocidad.
- Homogeneizador de Alta Presión.

5.4.1. Molino de Perlas de Alta Velocidad

Los molinos de perlas de alta velocidad pueden ser operados en dos formas: a) por lotes y b) continua.

Operación por lotes

Los molinos de perlas pueden ser operados en forma intermitente cuando el volumen de la suspensión celular a tratar es bajo, o cuando se desea efectuar experimentos para generar datos de diseño (Mayerhoff *et al.*, 2008).

En una operación por lotes, inicialmente se carga el molino con las perlas y la suspensión celular. Durante la operación se cierra la salida de suspensión y se agita a la velocidad establecida.

El grado de rompimiento logrado puede ser determinado de dos formas: a) Directamente: Contando el número de células intactas por unidad de volumen y b) Indirectamente: Mediante la medición de un componente liberado durante el rompimiento. En el caso de productos de tipo proteico la determinación de proteína total y/o la actividad enzimática son mediciones comúnmente utilizadas (Ramanan *et al.,* 2008).

El rompimiento celular por lotes en molinos de perlas agitados a altas velocidades sigue una cinética de primer orden (Doucha y Lívanský, 2008). El balance de masa de proteína liberada puede ser expresado mediante la ecuación siguiente:

$$V_M \frac{dR}{dt} = k(R_m - R)V_M \tag{5.6}$$

La ecuación anterior establece que la velocidad de liberación de la masa de proteína (células rotas) es proporcional a la masa de proteína presente no liberada donde:

V_M: Volumen libre del molino. $[L^3]$.

R_m: Concentración máxima de proteína obtenible. $[M/L^3]$.

R: Concentración de proteína liberada en el tiempo t. $[M/L^3]$.

t: Tiempo de operación. En el caso de la molienda por lotes el tiempo de operación t es igual al tiempo de residencia de las células en el molino. $[t]$.

k: Constante de velocidad específica de primer orden que depende del tipo de célula, del tipo y velocidad del agitador, de la carga y tamaño de las perlas, de la concentración celular y de la temperatura. $[t^{-1}]$.

La ecuación anterior puede ser integrada arreglándola de la siguiente forma:

$$\int_0^R \frac{dR}{R_m - R} = k \int_0^t dt \tag{5.7}$$

Para obtener la ecuación de la operación por lotes:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = kt \tag{5.8}$$

De acuerdo a la ecuación anterior las gráficas de

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) \quad vs \quad t$$

producirán rectas de pendiente k y ordenada al origen cero.

En la Figura 5.13 se muestra la liberación de proteína a partir de *Sacharomyses cerevisiae* utilizando un molino Netzsch LME20 con diferentes tipos de agitadores. El resultado muestra claramente que la desintegración celular sigue una cinética de primer orden independiente del tipo de agitador. Observándose también diferentes valores de k para cada tipo de agitador.

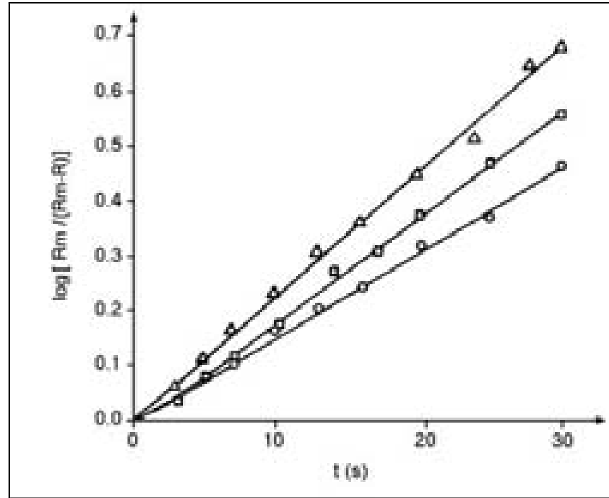


Figura 5.13: Liberación de proteína a partir de *Sacharomyses cerevisiae* en experimentos con recirculación con diferentes tipos de agitadores. (△) postes; (◇) concéntrico; (O) excéntrico. Fuente: Kula y Schütte, 1987.

En el caso que el grado de rompimiento sea seguido mediante la actividad enzimática A, la ecuación (5.8) puede ser expresada como:

$$\ln\left(\frac{A_m}{A_m - A}\right) = kt \tag{5.9}$$

Ejemplo 5.2. Cinética de rompimiento por lotes.

En el rompimiento por lotes para la obtención de una enzima de *S. cerevisiae*, se utilizó un molino de perlas de alta velocidad de 4 litros obteniéndose los siguientes datos:

Tiempo (s)	$R \times 10^2$ (kg/kg)	$A \times 10^2$ (mol/min−kg)
00	0.000	0.000
15	1.025	0.625
30	2.150	1.150
45	2.525	1.675
60	3.425	2.150
Max.	10.000	6.700

Se pide calcular:
a) La constante cinética para la liberación de proteína.
b) La constante cinética para la liberación de enzima.
Solución:
Las constantes cinéticas pueden ser obtenidas mediante el empleo de las ecuaciones (5.8) y (5.9). Los cálculos necesarios son los siguientes:

Tiempo (s)	$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right)$	$\ln\left(\frac{A_m}{A_m - A}\right)$
00	0.0000	0.0000
15	0.1081	0.0979
30	0.2421	0.1883
45	0.2910	0.2877
60	0.4193	0.3870

a) Mediante un ajuste de los datos por mínimos cuadrados se puede obtener para la liberación de proteína la constante,

$$k = 6.984 \times 10^{-3}\ \mathrm{s}^{-1}$$

b) De igual manera, para la liberación de enzima la constante es:

$$k = 6.412 \times 10^{-3}\ \mathbf{s}^{-1}$$

Operación continua

Durante la operación continua del molino de perlas, la suspensión celular a tratar es alimentada continuamente al molino en uno de sus extremos y retirada continuamente en el extremo opuesto.

En el diseño de los molinos de perlas es necesario considerar el grado de dispersión de los tiempos de residencia de las células en el molino. A diferencia de la operación por lotes, en una operación continua el tiempo de residencia varía para las diferentes células de la suspensión, generándose una distribución de tiempos de residencia de la población celular. El tiempo de residencia medio $\bar{t}$ de la distribución de tiempos de residencia es diferente al tiempo de residencia ideal t_R dado por:

$$t_R = \frac{V_M}{F}$$

donde:

t_R: Tiempo de residencia ideal. $[t]$.

V_M: Volumen libre del molino. $[L^3]$.

F: Flujo alimentado al molino. $[L^3/t]$.

Grado de mezclado en un molino de perlas. El grado de desviación del flujo tapón ideal en los molinos de perlas comerciales, ha sido simulado utilizando el modelo de "Tanques en serie perfectamente agitados" (Fig. 5.14). Mediante el uso de este modelo los experimentos con pulsos de tinta permiten determinar el número de tanques perfectamente agitados en serie a que equivale el grado de mezclado que se presenta en el molino (Shütte y Kula, 1990).

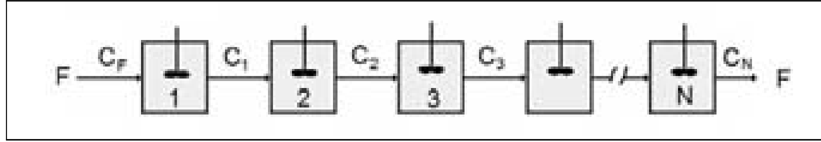


Figura 5.14: Representación conceptual de un molino de perlas continuo con el modelo de "Tanques en serie perfectamente agitados".

Al aplicar un pulso de tinta en la primera etapa de una serie de tanques perfectamente agitados de igual volumen, el balance de la masa de tinta para cualquier etapa N está dado por la expresión:

$$\frac{V_M}{N}\frac{dC_N}{dt} = F(C_{N-1} - C_N) \tag{5.10}$$

donde:

N: Número de etapas de la serie.

C_N: Concentración de tinta en la etapa N. $[M/L^3]$.

Utilizando un tiempo adimensional definido por:

$$\theta = \frac{tF}{V_M} = \frac{t}{t_R}$$

la ecuación (5.10) puede expresarse como:

$$\frac{dC_N}{d\theta} = N\left(C_{N-1} - C_N\right) \tag{5.11}$$

con las condiciones:

$$\theta < 0 \qquad C_N = 0 \qquad N = 1, 2, 3, ..N$$

$$\theta = 0 \qquad C_1 = NC_0$$

$$\theta \ > 0 \qquad C_F = 0$$

En este análisis C_0 es la concentración que se obtendría por el mezclado instantáneo del pulso en todo el volumen del molino.

Para la etapa número 1 la ecuación de balance se reduce a:

$$\frac{dC_1}{d\theta} = -NC_1 \tag{5.12}$$

y la forma integrada es:

$$\int_{NC_o}^{C_1} \frac{dC_1}{C_1} = -N \int_{o}^{\theta} d\theta \tag{5.13}$$

de tal manera que:

$$\frac{C_1}{C_0} = N \exp(-N\theta) \tag{5.14}$$

La ecuación de balance de la segunda etapa se expresa como:

$$\frac{dC_2}{d\theta} + NC_2 = N^2 C_0 \exp(-N\theta) \tag{5.15}$$

o en forma integrada:

$$\frac{C_2}{C_0} = N^2 \theta \exp(-N\theta)$$

Siguiendo este procedimiento es posible demostrar que para la etapa N se tiene que:

$$E(\theta) = \frac{C_N}{C_0} = \frac{N^N \ \theta^{N-1}}{(N-1)!} \exp(-N\theta) \tag{5.16}$$

En los estudios de mezclado $E(\theta)$ es una medida de la distribución de tiempos de residencia del fluido dentro del recipiente (Levenspiel, 1972).

La aplicación práctica del desarrollo anterior puede visualizarse derivando la ecuación (5.16) respecto a θ e igualando el resultado a cero para obtener:

$$N = \frac{1}{(1 - \theta_{máx})} \tag{5.17}$$

donde $\theta_{máx}$ es el tiempo adimensional al cual E es máxima. De tal manera que el número de etapas a que equivale el grado de mezclado de un molino, puede ser determinado a partir de los datos experimentales de concentración contra tiempo que resultan al aplicar un pulso de trazador.

Ejemplo 5.3. Respuesta de una serie de tanques agitados a la entrada de un pulso.

Graficar las curvas de respuesta de una serie de tanques agitados a la entrada de un trazador de pulso, para diferentes números de tanques.

Solución:

En la Figura 5.15 se presenta un programa MATLAB para obtener la gráfica de las curvas de respuesta que se muestran en la Figura 5.16.

```
% Bioseparaciones 2da Edicion
% Ejemplo_5.3 Respuesta de tanques en serie
% Nombre del archivo ejemplo_5.3
clear
clf
% Entrada de datos y cálculos
for n=2:4:18
teta=[0:0.05:3];
nteta=n*teta;
eteta(:,n)=n*(n*(nteta.^(n-1))).*exp(-nteta)/factorial(n);
end
% Impresion de resultados
plot(teta,eteta(:,2),'kd-');
xlabel('\theta')
ylabel('E(\theta)')
hold on
plot(teta,eteta(:,6),'kp-');
hold on
plot(teta,eteta(:,10),'kv-');
hold on
plot(teta,eteta(:,14),'ks-');
hold on
plot(teta,eteta(:,18),'ko-');
legend('N=2','N=6','N=10','N=14','N=18')
```

Figura 5.15: Programa para obtener las curvas de respuesta del Ejemplo 5.3.

Puede observarse en la Figura 5.16 que entre mayor sea el número de etapas, el sistema presenta menor dispersión del pulso.

Eficiencia de los molinos de perlas El número de etapas de un molino de perlas obtenido mediante experimentos de pulsos, puede ser empleado para calcular la eficiencia de rompimiento esperada.

Para relacionar el número de etapas con la eficiencia de rompimiento es necesario realizar un balance de proteína liberada (células rotas) considerando que el molino consta de N etapas tipo tanque perfectamente mezclados en serie, y que el rompimiento sigue una cinética de primer orden.

El balance de proteína liberada en la primera etapa de la serie está dado por:

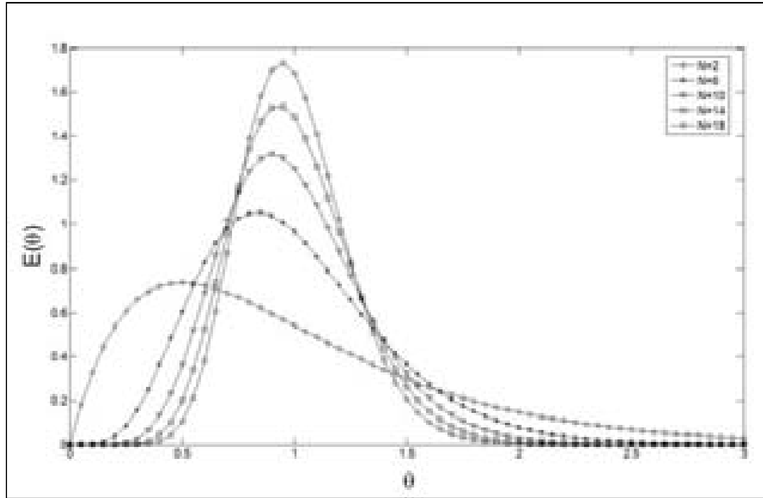


Figura 5.16: Respuesta de una serie de tanques agitados a la entrada de un pulso.

$$\frac{V_M}{N}\frac{dR_1}{dt} = -FR_1 + k(R_m - R_1)\frac{V_M}{N} \tag{5.18}$$

donde:

R_1: Concentración de proteína liberada en la etapa 1. $[M/L^3]$.

t: Tiempo de operación. $[t]$

k: Constante de velocidad específica de primer orden. $[t^{-1}]$

La ecuación anterior puede ser expresada en función de un tiempo adimensional dado por:

$$\tau = \frac{tF}{NV_M} \tag{5.19}$$

y obtener,

$$\frac{dR_1}{d\tau} = -R_1 + \frac{kV_M}{NF}(R_m - R_1) \tag{5.20}$$

La ecuación anterior puede ser integrada con las condiciones:

$$\tau = 0 \qquad R_1 = 0$$

$$\tau = 1 \qquad R_1 = R_1$$

y obtener:

$$R_1 = R_m \left(\frac{\frac{kV_M}{NF}}{1 + \frac{kV_M}{NF}} \right) \tag{5.21}$$

La ecuación anterior también puede ser expresada como:

$$\frac{R_m}{R_m - R_1} = \left(1 + \frac{kV_M}{NF}\right) \tag{5.22}$$

Continuando con este procedimiento puede ser demostrado que para la etapa N se tiene:

$$\frac{R_m}{R_m - R_N} = \left(1 + \frac{kV_M}{NF}\right)^N \tag{5.23}$$

Ejemplo 5.4. Determinación del número de etapas equivalentes de un molino de perlas.

Un molino de perlas tipo piloto con cámara de 4 litros de volumen, se carga de perlas de tal manera que la fracción de volumen libre es de 0.48 respecto al volumen de la cámara.

Para determinar el número de etapas del molino de acuerdo al modelo de tanques en serie, se introduce un pulso de tinta al molino cuando éste opera en forma estacionaria con un flujo de 50 L/h. Los datos de concentración a la salida del molino aparecen en las columnas (1) y (2) de la Tabla siguiente:

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
t (s)	$C(U)$	$C\Delta t$	θ	E
0	0	0.0	0	0.000
25	11.5	143.8	0.18	0.097
50	52.2	796.3	0.36	0.442
75	93.0	1815.0	0.54	0.788
100	107.3	2503.8	0.72	0.909
125	101.7	2612.5	0.90	0.861
150	85.3	2337.5	1.09	0.722
175	65.0	1878.8	1.27	0.550
200	47.5	1406.3	1.45	0.402
225	32.8	1003.8	1.63	0.278
250	21.8	682.5	1.81	0.185
275	14.1	448.8	1.99	0.119
300	8.8	286.3	2.17	0.075
325	5.4	177.5	2.35	0.046
350	3.3	108.8	2.53	0.028
375	1.9	65.0	2.71	0.016
400	1.1	37.5	2.89	0.009
425	0.6	21.3	3.07	0.005
	Suma =	16,325		

Se pide:
a) Calcular el tiempo de residencia ideal.
b) Estimar el valor de C_0.
c) Obtener la gráfica de E vs θ.
d) Estimar el número de etapas N.
e) Calcular la eficiencia por etapa si $k = 1.93 \times 10^{-2}$ s^{-1}
f) Calcular la eficiencia global de las N etapas.

Solución:

a) El tiempo de residencia ideal está dado por:

$$t_R = \frac{V_M}{F} = \frac{4 \text{ L} \times 0.48 \times 3600 \ \dfrac{\text{s}}{\text{h}}}{50 \ \dfrac{\text{L}}{\text{h}}} = 138.24 \text{ s}$$

b) El valor de C_0 puede ser estimado mediante la expresión:

$$C_0 = \frac{(F)\left(\sum C\Delta t\right)}{V_M}$$

Utilizando el método de los trapecios, se obtienen los datos de la columna (3) de la tabla anterior, de tal manera que:

$$C_0 = \frac{16325}{138.24} = 118.1 \text{ Unidades}$$

c) En las columnas (4) y (5) de la tabla anterior aparecen los cálculos del tiempo adimensional θ y la concentración adimensional E. La Figura 5.17 muestra un programa MATLAB para obtener la curva correspondiente.

```
% Bioseparaciones 2da Edicion
% Ejemplo_5.4 Determinación del número de etapas equivalentes
% de un molino de perlas.
% Nombre del archivo ejemplo_5_4.m
clc; clear; clf
% Entrada de datos
v=4; % L
fvv=0.80;
f=50;  %L/h
f=50/3600; % L/s
t=[0 25 50 75 100 125 150 175 200 225 250 275 300 325 350,...
    375 400 425];% s
c=[0 11.5 52.2 93.0 107.3 101.7 85.3 65.0 47.5 32.8 21.8,...
    14.1 8.8 5.4 3.3 1.9 1.1 0.6];% U
% Cálculos para obtener la gráfica de distribución de
% tiempos de residencia
vm=fvv*v;
tr=vm/f; % s
cOdt = trapz(t,c);
c0=f*cOdt/vm;
e=c/c0;
teta=t/tr;
% Cálculos para obtener el tiempo máximo
[em,i]=max(e);
tetam=teta(i);
% Calculo de número de etapas
n=1/(1-tetam);
N=round(n);
% Impresión de resultados
plot(teta,e,'ko');
xlabel('\theta')
ylabel('E(\theta)')
axis([0,4,0,1])
n1=num2str(N);
ncad=['N =', n1];
text(2,0.6, ncad)
hold on
% Impresión de resultados suavizados
tetax=[0:0.001:4];
ex = spline(teta,e,tetax);
plot(tetax,ex,'k');
% Fin del programa
```

Figura 5.17: Programa MATLAB para la obtención del número de etapas y la curva de distribución de tiempos de residencia del Ejemplo 5.4.

La Figura 5.18 muestra la curva de la distribución de tiempos de residencia. Los círculos corresponden a los datos experimentales y la línea continua es una curva ajustada.

d) De la Figura 5.18 se puede determinar que cuando E presenta un máximo,

$$\theta_{máx} = 0.72$$

Utilizando la ecuación (5.17) se obtiene:

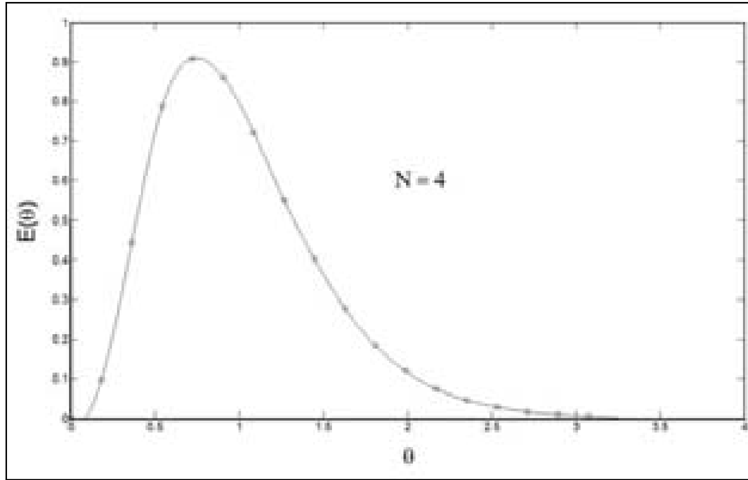


Figura 5.18: Distribución de tiempos de residencia del Ejemplo 5.4.

$$
\begin{aligned}
N &= \frac{1}{(1-\theta_{máx})} \\
N &= \frac{1}{(1-0.72)} \\
N &\simeq 4
\end{aligned}
$$

e) La eficiencia de rompimiento en cada etapa de acuerdo con la ecuación (5.21) es:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\left(\dfrac{kV_M}{NF}\right)}{1+\left(\dfrac{kV_M}{NF}\right)}$$

el valor del grupo entre paréntesis de la expresión anterior es:

$$\frac{kV_M}{NF} = \frac{(1.93\times 10^{-2}\ s^{-1})(138.24\ s)}{4} = 0.667$$

de tal manera que:

$$\text{Eficiencia} = \frac{0.667}{1+0.667} = 0.4$$

f) La eficiencia global puede ser obtenida a partir de la ecuación (5.23),

$$\frac{R_m}{(R_m - R_N)} = (1+0.667)^4 = 7.716$$

de tal manera que:

$$\frac{R_N}{R_m} = 0.87$$

La eficiencia global de rompimiento en el molino es del 87 %.

5.4.2. Homogeneizador de Alta Presión

La desintegración celular en un homogeneizador de alta presión a una presión fija dada puede ser descrita mediante una cinética de primer orden respecto al número de pasos, de tal manera que:

$$\frac{dR}{dN} = k^{'}(R_m - R) \tag{5.24}$$

donde:

R: Concentración de proteína liberada (células rotas) después de N pasos. $[M/L^3]$.

R_m: Concentración máxima de proteína que puede ser liberada. $[M/L^3]$.

N: Número de pasos a través de la válvula del homogeneizador.

$k^{'}$: Constante cinética de primer orden. [1/pasos]

La ecuación anterior puede ser integrada con las condiciones:

$$N = 0 \qquad R = 0$$

$$N = N \qquad R = R$$

obteniéndose la ecuación:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = k^{'}N \tag{5.25}$$

Se ha determinado experimentalmente que la constante $k^{'}$ tiene una dependencia con la presión dada por:

$$k^{'} = k^{"}P^a \tag{5.26}$$

donde:

P: Presión de operación. $[M/t^2L]$.

$k^{"}$: Constante dimensional de rompimiento. $[M^{-a}t^{2a}L^{2a}/\text{pasos}]$.

a: Parámetro constante en rangos limitados de presión. Un valor típico para levaduras es $a = 2.9$ y para *E. coli* $a = 2.2$.

Combinando las ecuaciones (5.25) y (5.26) se obtiene:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = k^{"} P^a N \tag{5.27}$$

El proceso de rompimiento celular descrito por la ecuación (5.27), es independiente de la concentración celular. Por otra parte, se ha reportado que la actividad de enzima liberada en relación a la proteína total liberada, es independiente de la presión de operación, de la temperatura, y de la concentración inicial de células en el caso de levaduras. Sin embargo, la fracción de enzima liberada respecto a la enzima total presente depende de la localización de la enzima particular dentro de la estructura celular (Sauer *et al.,* 1989).

Microfluidizador

En el caso del microfluidizador la cinética de rompimiento presenta una cierta dependencia no lineal con el número de pasos expresada mediante la ecuación:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = k^{"} P^a N^b \tag{5.28}$$

donde b es un exponente que varía con el tipo de célula y toma valores entre 0.28 y 1.00 (Sauer *et al.,* 1989).

Comparación de los métodos mecánicos de ruptura celular

La Tabla 5.5 muestra datos de producción de algunas enzimas utilizando el molino de perlas y el homogeneizador Manton-Gaulin. La ruptura celular utilizando el molino de perlas permite la obtención de un mayor porcentaje de enzima activa en un número menor de pasos en comparación con el homogeneizador. Sin embargo, la producción de proteína en el molino es en general menor que la obtenida en el homogeinizador.

La Tabla 5.6 muestra los datos para la liberación de la enzima β galactosidasa de células de *E. coli* utilizando un molino de perlas tipo Dyno Mill, un homogeneizador tipo Manton-Gaulin y un Microfluidizador. Estos datos muestran que el Microfluidizador permite manejar mayores concentraciones de biomasa y produce un rendimiento mayor de enzima activa. Además, el tamaño medio de los restos celulares que se producen en un paso es mayor que el encontrado en las mismas condiciones en el homogeneizador Manton-Gaulin.

Ejemplo 5.5. Rompimiento de *E. coli* en un microfluidizador.

En la recuperación de β galactosidasa de *E. coli*, se hace pasar por un microfluidizador tipo M-110 una suspensión celular que contiene 47.6 g/L en peso seco. La presión de operación utilizada fue de 60 MPa.

La cantidad de proteína liberada después de cada paso se presenta en las columnas (1) y (2) de la tabla siguiente:

Tabla 5.5: Comparación de métodos de rompimiento celular.

Micro-organismo	Enzima liberada	Molino de Perlas**			Homogeneizador***		
		Act. solub.*	Pasos No.	Prod. kg/h	Act. solub.*	Pasos No.	Prod. kg/h
Levaduras							
Saccharomyces carlsbergensis	D-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	86 %	1	60	91 %	4	60
Saccharomyces cerevisiae	D-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	98 %	1	70	95 %	4	60
Candida boidinii	Formato Deshidrogenasa	95 %	1	40	88 %	3	65
Bacterias							
B. cereus	Leucina deshidrogenasa	84 %	2	16	82 %	3	67
Brevibacterium ammoniagenes	Fumarasa	85 %	3	12	10 %	4	-
E. coli	Penicilina acilasa	95 %	3	7	89 %	3	67
Lactobacillus confusus	D-Lactato deshidrogenasa	92 %	2	20	84 %	3	65

* Actividad solubilizada
** Netzsch LME 20
*** Gaulin M3
Adaptada de: Kula y Schütte, 1987

Datos Ejemplo 5.5		
(1)	**(2)**	**(3)**
Paso	**% Proteína Liberada**	$\ln[R_m/(R_m - R)]$
1	63.0	0.994
2	79.0	1.560
3	88.0	2.120
5	96.0	3.219
10	99.9	6.908

Se pide:

a) Estimar el valor de la constante cinética de rompimiento considerando que para este caso $a = 2.2$ y $b = 1$.

b) Estimar el número de pasos para liberar el 93 % de proteína en este proceso.

Solución:

a) De acuerdo con la ecuación (5.28) el grado de rompimiento para este caso puede ser expresado como:

Tabla 5.6: Ruptura de células de *E. coli* con diferentes métodos.

Método	Peso seco de biomasa (g/L)	liberación de β-Galactosidasa		Distribución de tamaño		Viscosidad a*	
		Proteína (%)	Actividad (%)	media (nm)	Pico(s) (nm)	10 s^{-1} (mPa-s)	100 s^{-1} (mPa-s)
Molino de Perlas*							
2 min.	49.5	62	62	612	461, 806	63	28
3 min.	49.5	72	74	553	465, 787	38	19
4 min.	49.5	79	79	529	471, 777	19	14
Manton-Gaulin**							
1 paso	48.4	66	58	501	457	113	30
2 pasos	48.4	76	75	414	180, 457	8	6
3 pasos	48.4	82	78	217	191	8	6
Microflui - dizador**							
1 paso	101.9	62	62	693	493, 833	51	26
1 paso	73.2	65	61	693	489, 800	35	15
1 paso	47.6	63	61	673	486, 800	28	10
2 pasos	47.6	79	76	480	468	10	7
3 pasos	47.6	88	87	451	445	6	6
5 pasos	47.6	96	97	-	-	-	-
10 pasos	47.6	100	100	-	-	-	-

*Dyno Mill KDL a diferentes tiempos promedios de residencia
** Homogeneizador
Adaptada de: Agerkvist y Enfors, 1990

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = k^{"} P^{2.2} N$$

de tal manera que de la pendiente de la gráfica de $\ln[R_m/(R_m - R)]$ contra N es posible estimar $k^{"}$. Los cálculos necesarios se muestran en la columna (3) de la tabla anterior. Mediante un ajuste por mínimos cuadrados de estos datos se obtiene:

$$k^{"} P^{2.2} = 0.688$$

y para $P = 60$ MPa,

$$k^{"} = 8.4 \times 10^{-5}\ \mathrm{MPa}^{-2.2}$$

b) El número de pasos requeridos para una liberación del 93 % de proteína es:

$$N = \frac{\ln\left(\frac{1}{1.00 - 0.93}\right)}{0.000084 \times 60^{2.2}} = 3.88 \text{ pasos} \quad \text{(Se necesitan 4 pasos de molienda.)}$$

5.5. Sumario

El rompimiento celular es una operación necesaria cuando el producto de interés se localiza al interior de la célula. Existen varios métodos para efectuar esta operación. A nivel industrial se emplean principalmente los molinos de perlas agitados y los homogeneizadores de alta presión. El diseño de los molinos está basado en ecuaciones empíricas y en experimentos piloto.

5.6. Problemas

5.1. Rompimiento celular en molino de perlas. En estudios de liberación de proteína intracelular en función de la velocidad del agitador empleando un molino de perlas tipo Netzsch LME 4, con perlas de diámetro entre 0.55 y 0.85 mm , se utilizó una suspensión celular de concentración de 50 % (peso/volumen), un flujo de alimentación de 50 L/h y una carga de perlas del 85 %. Bajo estas condiciones se obtuvieron los siguientes datos:

rpm	**Proteína liberada** (mg/mL)
1200	15.88
1500	22.35
1750	22.90
2000	22.94
2250	23.00

Se pide:
a) Estimar la velocidad óptima para el agitador.
b) Discutir sobre el consumo de potencia del agitador para velocidades superiores a la óptima.
Resp. a) 1500 rpm

5.2 . Comparación de agitadores. La desintegración celular por lotes con dos tipos de agitadores utilizados en un molino de perlas producen los siguientes datos:

Agitador 1			**Agitador 2**	
Tiempo de residencia (min)	$\log[R_m/(R_m - R)]$		Tiempo de residencia (min)	$\log[R_m/(R_m - R)]$
3	0.037		3	0.060
5	0.090		5	0.150
10	0.160		10	0.225
15	0.225		15	0.325
20	0.300		20	0.425
25	0.365		25	0.525
30	0.437		30	0.650

Se pide:
a) Estimar la constante cinética k para cada tipo de agitador.
b. Calcular el tiempo para el cual se obtiene el 80 % de rompimiento con cada tipo de agitador.

Resp. a) $k_1 = 0.015\ \text{min}^{-1}$ y b) $t_1 = 53.33$ min

5.3. Número de pasos en un homogeneizador. Una suspensión celular que contiene la bacteria Gram negativa *Alcaligenes eutrophus*, se hace pasar por un homogeneizador APV Gaulin 15M 8BA con el propósito de estudiar la recuperación de poli-β-hidroxibutirato (PHB) un termoplástico potencial (Harrinson *et al.*,1990).

Cuando se opera a una presión constante de 15.2 MPa la constante $k^"$ del homogeneizador toma un valor $5.05 \times 10^{-4}\ \text{MPa}^{-2.2}$.

Se pide:

a) Estimar el número de pasos necesarios para lograr el 63 % de rompimiento.

b) Si la presión de operación se duplica, ¿en cuántos pasos se obtendrá el mismo rendimiento?

Resp. a) 5 pasos.

5.4. Calentamiento en un homogeneizador. Ha sido reportado (Bjustrom, 1985) que el calor liberado por compresión adiabática durante un proceso de homogeneización puede elevar la temperatura de la corriente que entra al homogeneizador 1.5 °C por cada 6.895 MPa de presión de operación.

Se pide: Calcular cuánto representa este valor experimental de la conversión ideal de trabajo presión-volumen.

Resp. 91 %

5.5. Obtención de ecuaciones de grado de mezclado. Obtener las ecuaciones (5.16) y (5.17) mediante el desarrollo descrito en el texto.

5.6. Parámetros de homogeneizador. En un rompimiento celular utilizando un homogeneizador es posible lograr 80 % de rompimiento bajo las dos diferentes condiciones siguientes:

Condición	**Presión** (MPa)	**Pasos**
1	90	1
2	50	3

Se pide:

a) Estimar los parámetros cinéticos del homogeneizador.

b) Comparar la energía por unidad de masa de alimentación necesaria para cada condición.

c) Qué condición se recomienda para realizar la ruptura.

Resp. a) $k^" = 3.56 \times 10^{-4}\ \text{MPa}^{-1.87}$ y b) 67 % de diferencia.

5.7. Eficiencia global. Obtener la ecuación (5.23) mediante el procedimiento descrito en el texto.

5.8. Selección de homogeneizadores. Se desea recuperar la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa de cultivos de *Leuconostoc mesenteroides* por homogeneización a alta presión en una o más unidades en un tiempo de 6 horas.

El caldo de fermentación a procesar son 100 m^3 con una concentración celular de 7.0 g/L. Antes de la ruptura el caldo se concentra en una centrífuga hasta alcanzar una concentración de 80.0 g/L.

Las pruebas de molienda indican que el *L. mesenteroides* es dificil de romper y requiere 5 pasos de molienda a 8,000 psi para obtener un 90 % de recuperación de la proteína intracelular. Asimismo, que la constante de ruptura es dependiente de la presión y tiene la siguiente proporcionalidad:

$$k^{'} \propto P^{1.8} \tag{5.29}$$

Para realizar el rompimiento se dispone de los equipos cuyas capacidades y costos aparecen en la siguiente tabla.

Tipo	**Capacidad (m^3/h)**	**Costo ($)**
A	0.45	22,000
B	1.14	32,000
C	2.27	45,000
D	4.54	69,000

Se pide:

a) Si se desea minimizar la inversión de capital, establecer el número y tipo de equipo que se requiere si se realizan 1, 2, 3, 4 o 5 pasos de rompimiento (completar tabla siguiente).

Pasos	**Flujo(m^3/h)**	**Unidades**	**Tipo**	**Costo ($)**
1		1	C	45,000
2				
3				
4				
5				

b) Establecer la presión de operación necesaria para alcanzar un 90 % de recuperación de la proteína intracelular si se utilizan 1, 2, 3, 4 o 5 pasos de ruptura.

c) En función de las respuestas de los incisos a) y b), seleccione el equipo a utilizar.

5.9. Consumo de potencia. La cinética de rompimiento en un homogeneizador a escala piloto se puede representar por la ecuación (5.27).

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = k^{'}N = k^{"}P^{a}N \tag{5.27}$$

En este sistema se han obtenido los siguientes datos experimentales del rompimiento de levaduras de panificación en un solo paso, sobre la influencia de la presión de operación en la constante cinética de rompimiento de primer orden:

P $\left(\text{kg}_f/\text{cm}^2\right)$	k'
200	0.020
270	0.045
330	0.070
500	0.290

La potencia requerida por paso en el molino, varía linealmente con la presión de operación con una constante de proporcionalidad de 7.63×10^{-3} kW$-$cm^2/kg$_f$.

Se pide:

a) Obtener una expresión del porcentaje de proteína liberada por kW de potencia.

b) Calcular la presión óptima en relación a la potencia necesaria para $N = 1$.

c) Repetir el cálculo para $N = 2$.

d) Cuántos pasos son recomendables?

Resp. b) $1,000$ kg$_f$/cm^2

5.10. Molino de perlas. Se está desarrollando un proceso para producir una proteína terapéutica como producto intracelular de una levadura. Los estudios de rompimiento a nivel laboratorio se realizan en un molino de perlas de alta velocidad que consta de un agitador de 7 discos tipo espiral, operando en forma continua.

En una prueba por lotes realizada con 100 L de caldo conteniendo 30.0 g/L de células en peso seco, la cantidad de proteína intracelular liberada en función del tiempo se muestra en la tabla siguiente:

Tiempo	**Proteína**
(min)	(g)
1	400
2	990
3	1,200
4	1,100
5	1,410
6	1,425
7	1,475
8	1,473
9	1,483
10	1,490

Se pide:

Si la operación del molino cuyo volumen libre es de 100 L se realiza en forma continua, alimentando el caldo a un flujo F, ¿cúal es la máxima velocidad de dilución ($D = F/V$) que puede ser utilizada que permita obtener un 95 % de liberación de proteína?. Se pude suponer que las levaduras contienen el 50 % en peso seco de proteínas y el molino 4 etapas.

Resp. 0.117 min^{-1}.

5.7. Bibliografía

Agerkvist, I.; Enfors, S. **1990**. Characterization of *E. coli* cell desintegrates from a bead mill and high pressure homogenizers. *Biotech. Bioeng.* 36, 1083-1089.

Andrews, B.A.; Huang, R. B.; Asenjo, J.A. **1990**. Differential product release from yeast cells by selective enzymatic lysis. En: *Separations for Biotechnology.* Pyle, D. L. (Ed.). Elsevier Applied Science. England. 21-28.

Asenjo, J.A. **1990**. Cell disruption and removal of insolubles. En: *Separations for Biotechnology.* Pyle, D.L. (Ed.). Elsevier Applied Science. England. 11-20.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu; Wei-Shou. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley & Sons. New York. 77-88.

Benov, L.; Al-Ibraheem, J. **2002**. Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of methods. *J. Biochem. Molec. Biol.* 35, 428-431.

Bjustrom, Ed. **1985**. Biotechnology: Fermentation and downstream processing. *Chem. Eng.* 18, 126-159.

Danilevich, V.N.; Petrovskaya, L.E.; Grishin, E.V. **2008**. A highly efficient procedure for the extraction of soluble proteins from bacterial cells with mild chaotropic solutions. *Chem. Eng. Technol.* 31, 904–910.

Datar, R.V.; Cartwright, T.; Rosen, C. **1993**. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: A case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology.* 11, 349-357.

Doucha, J.; Lívanský, K. **2008.** Influence of processing parameters on disintegration of Chlorella cells in various types of homogenizers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:431–440.

Edebo, L. **1969**. Desintegration of cell. En: *Fermentation Advances.* Perlman, D. (Ed.). Academic Press. London. 249-271.

Foster, D. **1992**. Cell disruption: Breaking up is hard to do. *Biotechnology.* 10, 1539-1541.

Harrison, S.T.; Dennis, J.S.; Chase, H. **1990**. The effect of culture history on the disruption of alcaligenes eutrophus by High Pressure Homogenisation. En: *Separations for Biotechnology.* Pyle, D. L. (Ed.). Elsevier Applied Science. England. 38-47.

Heim, A.; Kamionowska, U.; Solecki, M. **2007**. The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill. J. Food Eng. 83, 121–128.

Kelly, W.J.; Muske, K.R. **2004**. Optimal operation of high-pressure homogenization for intracellular product recovery. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27, 25–37.

Keshavarz, E.; Hoare, M.; Dunnill, P. **1987**. Biochemical engineering aspects of cell disruption. En: *Separations for Biotechnology.* Verral, M.S.; Hudson, M.J. (Ed.). Ellis Horwood Limited. England. 62-79.

Kula, M.R.; Schütte, H. **1987**. Purification of proteins and the disruption of microbial cells. *Biotech. Progr.* 3, 31-42.

Lehninger, A. L. **1989**. *Bioquímica.* Ediciones Omega. Barcelona, España.

Levenspiel, O. **1972**. *Chemical Reaction Engineering.* Segunda Edición. John Wiley and Sons. New York. 9, 242-308.

Mayerhoff, Z.D.V.L.; Franco, T.T.; Roberto, I.C. **2008**. A study of cell disruption of Candida mogii by glass bead mill for the recovery of xylose reductase. *Sep. Purif. Technol.* 63, 706–709.

Naglak, T.J.; Hettwer, D.J.; Wang, H.Y. **1990**. Chemical permeabilization of cells for intracellular product release. En: *Separations Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 7, 177-205.

Naglak, T.J.; Wang, H.Y. **1990**. Protein release from the yeast Ichia pastoris by chemical permeabilization: Comparison to mechanical disruption and enzymatic Lysis. En: *Separations for Biotechnology.* Pyle, D. L.(Ed.). Elsevier Applied Science. England. 55-64.

Petrides, D.P.; Cooney, C.R.; Evans, L.B. **1989**. An introduction to biochemical process design. En: *Chemical Enginnering Problems in Biotechnology.* Shuler, M.L. (Ed.). New York. 351-391.

Ramanan, R.N.; Ling, T.C.; Ariff, A.B. **2008**. The Performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells. *Biotech. Bioprocess Eng.* 13, 613-623.

Ramanan, R.N.; Tey, B.T.; Ling, T.C. ; Ariff, A.B. **2009**. Classification of pressure range based on the characterization of *Escherichia coli* cell disruption in high pressure homogenizer. A. *J. Biochem. Biotech.* 5, 21-29.

Sauer, T.; Robinson, C.; Glick, B. **1989**. Disruption of native and recombinant *E. coli* in a high-pressure homogenizer. *Biotech. Bioeng.* 33, 1330-1342.

Schütte, H.; Kula, M.R. **1990**. Bead mill disruption. En: *Separations Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 5, 107-141.

Scopes, R. **1994**. *Protein Purification: Principles and Practice.* Springer-Verlag. New York. 3, 41-71.

Wang, D.I.C. **1988**. Biotechnology: Status and Perspectives. *AIChE*. 84, 1-21.

Zaragoza, A.; Aranda, F.J.; Espuny, M.J. Teruel, J.A.; Marques, A.; Manresa, A.; Ortiz, A. **2009**. Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus sp. Langmuir*. 25, 7892–7898.

Parte III

Concentración del Producto

Esta Parte III del libro trata en el Capítulo 6 la operación de extracción y en el Capítulo 7 la de adsorción. Estas operaciones que son utilizadas para concentrar los producto diluidos de los caldos biológicos que son obtenidos en la etapa de recuperación del producto. Tanto la extracción como la adsorción son técnicas de separación no muy selectivas. Sin embargo, la adsorción cuando se realiza por afinidad es una técnica de separación altamente selectiva y necesaria en la etapa de purificación de productos en los cuales se requiere de una alta pureza.

Capítulo 6

Extracción

6.1. Introducción

La extracción líquido-líquido (E L-L) es una operación que permite la recuperación de un soluto de una solución mediante su mezcla con un solvente. El solvente de extracción debe ser insoluble o soluble en grado limitado en la solución que se va a extraer y el soluto a extraer debe presentar una elevada afinidad por el solvente de extracción. La extracción líquido-líquido se realiza básicamente en dos pasos (Fig. 6.1): a) mezcla íntima del solvente de extracción con la solución a procesar y b) separación de la mezcla en dos fases líquidas inmiscibles.

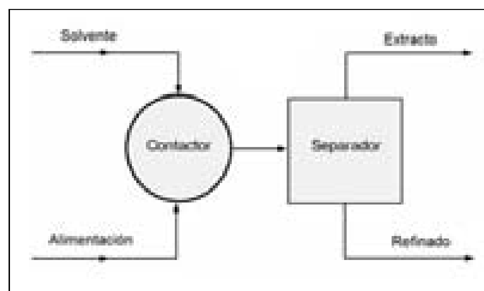


Figura 6.1: Esquema de un proceso de extracción de una etapa. Las fases se suponen inmiscibles.

Las sustancias que componen la solución original se distribuyen de diferente forma entre las dos fases líquidas y se logra un cierto grado de separación, mismo que puede incrementarse mediante el contacto en etapas adicionales.

En las operaciones de extracción la solución de la que se va a extraer el soluto se llama alimentación y el líquido con el cual se pone en contacto la alimentación se denomina solvente. El producto de la operación rico en solvente

se llama extracto y el líquido residual de donde se separó el soluto es el refinado.

En muchos procesos tradicionales de la ingeniería química la operación de separación más usada es la destilación debido a su simplicidad. Sin embargo, en muchas bioseparaciones la destilación no puede ser utilizada por la sensibilidad de los bioproductos a la temperatura, su baja volatilidad y las concentraciones tan bajas que se manejan.

La extracción es una técnica de separación que posee algunas ventajas que la hacen atractiva para los procesos de bioseparación. Entre ellas se encuentra la vasta experiencia y desarrollo tecnológico alcanzado en muchos años, la relativa facilidad con que se pueden escalar los procesos extractivos y la posibilidad de operar la extracción en forma continua.

Existen dos tipos principales de extracción L-L: a) la extracción agua-solvente orgánico que se emplea ampliamente en la industria de los antibióticos y b) la extracción que utiliza dos fases acuosas inmiscibles que se utiliza para concentrar proteínas y separar componentes biológicos. La extracción también puede ser usada para remover impurezas de una corriente.

En este capítulo, en la sección 6.2 se abordan los aspectos fundamentales de la extracción. Los equipos más utilizados para realizar operaciones de extracción se presentan en la sección 6.3, mientras que los aspectos básicos del diseño de extractores por lotes y continuos se revisan en la sección 6.4.

6.2. Fundamentos de la Extracción

La operación de extracción implica el uso de tres tipos de sustancias cuando menos: el soluto de interés y los componentes puros de cada una de las dos fases líquidas. La interacción de estos componentes y/o la presencia de más solutos o solventes genera cierto grado de complejidad de la operación.

El establecimiento de los aspectos termodinámicos básicos de la extracción permiten visualizar algunos enfoques que contribuyen a realizar esta operación en forma más racional, particularmente contribuyen a una selección adecuada del solvente de extracción y de las condiciones de operación. Los principios básicos de la extracción convencional líquido-líquido pueden ser extendidos a los sistemas de extracción de dos fases acuosas inmiscibles.

Con base a lo anterior esta sección se centra en cuatro aspectos:

- Tipos de sistemas de extracción líquido-líquido.
- Química de la extracción.
- Selección del solvente.
- Sistemas de dos fases acuosas inmiscibles.

6.2.1. Tipos de Sistemas de Extracción Líquido-Líquido

Los sistemas de extracción existentes presentan diferente grado de complejidad debido principalmente a lo siguiente:

a) Las fases pueden ser completamente o parcialmente miscibles. En este último caso, las relaciones de equilibrio y los balances de masa necesarios para el diseño de los equipos requieren cálculos adicionales.

b) La presencia de otros solutos diferentes al soluto de interés.

c) La naturaleza de las fases. En la extracción convencional líquido-líquido generalmente una fase es acuosa y la otra la constituye un solvente orgánico. Otros sistemas emplean dos fases acuosas inmiscibles.

Recientemente, se han revisado estas técnicas de extracción L-L de biomoléculas, conjuntamente con otras más novedosas como los sistemas miscelares (Mazzola *et al.*, 2008).

En este capítulo se analizan básicamente los aspectos de la extracción en sistemas de un soluto diluido en dos fases inmiscibles y la extracción en dos fases acuosas.

6.2.2. Química de la Extracción Líquido-Líquido

La extracción de un soluto desde una fase acuosa polar a una fase orgánica no polar, involucra con frecuencia interacciones hidrofóbicas. Las interacciones hidrofóbicas son responsables de un gran número de fenómenos físicos en soluciones acuosas. Aun en ausencia de interacciones específicas, la transferencia de un soluto desde el agua hasta el solvente, es favorecida debido al incremento en la entropia asociada con el desorden del agua.

Cuando un soluto es repartido entre las fases del extracto y el refinado, E y R, formando soluciones diluidas, al alcanzarse el equilibrio los potenciales químicos del soluto en ambas fases son iguales, es decir:

$$\mu(E) = \mu(R) \tag{6.1}$$

El potencial químico de las fases está dado por:

$$\mu^0(E) + \mathrm{R}T \ln A_E = \mu^0(R) + \mathrm{R}T \ln A_R \tag{6.2}$$

donde A_E y A_R son las actividades del soluto en las fases E y R respectivamente, R es la constante de los gases ideales y T es la temperatura.

En el caso de soluciones diluidas ideales la concentración es una medida apropiada de la actividad, de tal manera que la ecuación anterior se puede escribir como:

$$\mu^0(E) + \mathrm{R}T \ln x = \mu^0(R) + \mathrm{R}T \ln y \tag{6.3}$$

En extracción se define el coeficiente de partición como la relación de las concentraciones de soluto en el equilibrio, es decir:

$$K_p = \frac{x}{y} \tag{6.4}$$

donde:

K_p: Coeficiente de partición.

x: Fracción mol de soluto en la fase superior E (fase rica en solvente).

y: Fracción mol de soluto en la fase inferior R (fase correspondiente a la alimentación).

La ecuación (6.4) es conocida como Ley de la Distribución de Nerst y establece que en el equilibrio existe una relación constante de las actividades del soluto en las dos fases para una temperatura dada.

La ecuación (6.3) puede escribirse como:

$$\ln K_p = -\left[\frac{\mu^0(E) - \mu^0(R)}{\mathrm{R}T}\right] \tag{6.5}$$

o bien como:

$$\Delta G^0 = -\mathrm{R}T \ln K_p \tag{6.6}$$

donde ΔG^0 es el cambio en energía libre en el estado estándar. El logarítmo natural del coeficiente de partición K_p es proporcional a la diferencia de los potenciales químicos en los estados estándar de las fases puras.

En la Tabla 6.1 se muestran los valores del coeficiente de partición K_p para algunos solutos de interés en sistemas específicos.

Tabla 6.1: Coeficientes de partición para algunos solutos de interés.

Compuesto Tipo	Soluto	Solvente	K_p	Observaciones.
Aminoácidos	Glicina	n-butanol/agua	0.01	25 °C
	Lisina	n-butanol/agua	0.20	
	Ac. Glutámico	n-butanol/agua	0.07	
Antibióticos	Celesticetina	n-butanol/agua	110.00	
	Eritromicina	Amil acetato/agua	120.00	
			0.04	
	Novobiocina	Butil acetato/agua	100.00	a pH 7.0
			0.01	a pH 10.5
	Penicilina F	Amil acetato/agua	32.00	a pH 4.0
			0.06	a pH 6.0
	Penicilina K	Amil acetato/agua	12.00	a pH 4.0
			0.10	a pH 6.0
Proteínas	Glucosa isomerasa	PEG 1550/fosfato de potasio	3.00	
	Catalasa	PEG/dextrano crudo	3.00	

Adaptada de: Belter *et al.*, 1988.

Debido a la importancia del equilibrio termodinámico es conveniente puntualizar algunas de las propiedades del coeficiente de partición en la extracción:

a) El coeficiente se define sólo en un punto de equilibrio. No se aplica a todas las concentraciones posibles de encontrar en un sistema. En este sentido no debe confundirse con la constante de equilibrio del sistema.

b) El coeficiente de partición varía con el nivel de concentración de equilibrio.

c) Para sistemas diluidos el coeficiente de partición puede considerarse que es constante e igual a la constante de equilibrio.

d) La constante K_p a una temperatura dada, es independiente de la concentración o presión global del sistema.

e) La magnitud de la constante K_p, determina la extensión a la cual procederá una extracción particular bajo condiciones establecidas. Un valor alto de K_p indica que en el equilibrio la concentración de soluto en el extracto es mayor que en el refinado.

f) Los valores de K_p deben ser determinados experimentalmente.

Cuando se gráfica el potencial químico μ contra la concentración de soluto en la fase superior x (Fig. 6.2), en condiciones tales que una pequeña cantidad de fase superior E esté en equilibrio con un exceso de fase inferior R, se tiene lo siguiente: debido a que R está presente en exceso, el potencial químico $\mu(R)$ es constante, mientras que $\mu(E)$ varía con la concentración x. En la intersección de $\mu(E)$ y $\mu(R)$ se puede localizar la concentración x, en equilibrio, de soluto presente en E.

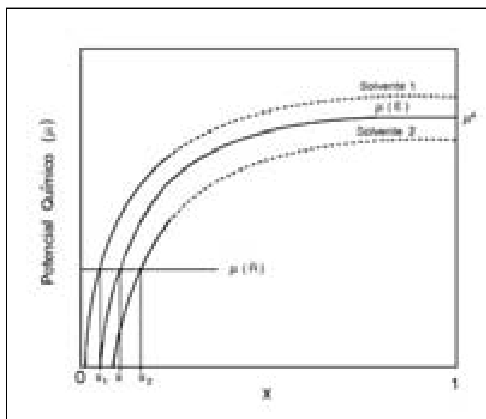


Figura 6.2: Comportamiento del potencial químico en función de la concentración x de soluto.

Cuando la concentración x aumenta, $\mu(E)$ aumenta y se aproxima a $\mu^0(E)$. Entonces se puede establecer que los cambios en el tipo de solvente cambian la concentración x en equilibrio. Por ejemplo, para el solvente 1 la concentración de equilibrio es x_1 y para el solvente 2 la concentración de equilibrio es x_2, entonces se puede concluir que el solvente 2 favorece esta extracción.

No sólo los cambios en el tipo de solvente pueden mejorar la extracción, sino también los cambios en el soluto que afecten su potencial químico $\mu^0(E)$.

Cambios en el solvente

Lo primero que puede hacerse para mejorar un sistema de extracción es cambiar el solvente de extracción, esto es, elegir uno cuyo potencial químico en el estado estándar esté más próximo a $\mu^0(R)$. Desafortunadamente esto no es fácil de lograr debido a que la teoría termodinámica no puede predecir con seguridad los potenciales químicos para determinar el mejor solvente. Sin embargo, es posible utilizar enfoques aproximados para el cálculo de coeficientes de partición, basados en la estimación de $\mu^0(E)$ utilizando parámetros de solubilidad. De acuerdo con este enfoque, el coeficiente de partición K_p dado por la ecuación (6.4) puede ser expresado como:

$$\ln K_p = \frac{V_R(\delta_A - \delta_R)^2 - V_E(\delta_A - \delta_E)^2}{\mathrm{R}TV_A} \tag{6.7}$$

donde V son los volúmenes molares parciales del solvente pesado R, el solvente ligero E y el soluto A, respectivamente. δ son los parámetros de solubilidad correspondientes.

El grado de disolución de sólidos en líquidos varía considerablemente con la naturaleza del sólido y del líquido, la temperatura y en grado menor con la presión. En todos los casos el límite de solubilidad es la saturación. En un sistema de un solvente y un soluto particular, la concentración de saturación a una temperatura y presión dadas es constante y no depende de la manera en que se prepara la solución.

La influencia de la temperatura sobre la solubilidad de un soluto en un solvente particular es generalmente muy pronunciada, debido a que la mayoría de las sustancias absorben calor al disolverse y son más solubles a una temperatura elevada.

Para estimar el parámetro de solubilidad del soluto de interés δ_A, es necesario realizar dos extracciones con diferente solvente cada una de ellas y cuyas solubilidades δ sean conocidas. Una vez determinado δ_A se pueden estimar los coeficientes de partición para nuevos solventes a partir de los valores δ_i conocidos. Estas son sólo estimaciones que pueden servir de guía para nuevos experimentos. En la Tabla 6.2 se muestran los parámetros de solubilidad para algunos solventes.

Cambios en el soluto

Cuando no es factible cambiar el solvente para mejorar una extracción ya sea por razones económicas o técnicas, entonces es necesario ver la posibilidad de realizar cambios en el soluto. Dado que el soluto es el producto que se desea obtener mediante la extracción, los posibles cambios deben ser de carácter reversible.

Cambios en el soluto por pares de iones Los cambios en el soluto dependen del comportamiento iónico que éste pueda tener. Si el soluto tiene comportamiento iónico y es posible encontrar un material que permita suprimir

Tabla 6.2: Parámetros de solubilidad para algunos solventes.

Solvente	δ (cal$^{1/2}$ cm$^{-3/2}$)
Amilacetato	8.0
Disulfuro de carbono	10.0
Tetracloruro de carbono	8.6
Cloroformo	9.2
Ciclohexano	8.2
Tolueno	8.9
Agua	9.4

esta ionicidad sin alterar el soluto, entonces la unión del soluto a este material permitirá aumentar la solubilidad del soluto en el solvente de extracción.

Los cambios a solutos empleando contraiones se basan en el hecho de que un soluto que es iónico en el agua, formará un par-ión sin carga neta en un solvente orgánico.

Esta formación de par-ión se puede ejemplificar cuando en una solución acuosa de cloruro de tetrabutilamonio se extrae el catión utilizando cloroformo:

$$K_p = \frac{\left[\mathrm{N(C_4H_9)_4^+ \text{ en cloroformo}}\right]}{\left[\mathrm{N(C_4H_9)_4^+ \text{ en agua}}\right]} = 1.3 \tag{6.8}$$

Si se agrega acetato de sodio a la solución acuosa de cloruro de tetrabutilamonio y se realiza nuevamente la extracción, se encuentra:

$$K_p = \frac{\left[\mathrm{N(C_4H_9)_4^+ \text{ en cloroformo}}\right]}{\left[\mathrm{N(C_4H_9)_4^+ \text{ en agua}}\right]} = 132 \tag{6.9}$$

Puede observarse que en el primer caso se extrae una solución diluida de par-ión de $N(C_4H_9)_4^+Cl^-$ y que en el segundo caso, se obtiene una solución más concentrada de par-ión de $CH_3COO^-N(C_4H_9)_4^+$.

El empleo de pares iónicos, requiere de la selección de contraiones solubles en la fase no polar. Este tipo de sustancias se conoce como sales grasas y se listan en la Tabla 6.3

Cambios en el soluto por pH Algunos productos que son de interés biotecnológico como las proteínas o los aminoácidos, son sensibles a cambios en el pH por lo que el conocimiento y comprensión de las propiedades ácido-base de los aminoácidos es sumamente importante en las bioseparaciones de proteínas. Muchos de los solutos que se desean aislar son ácidos o bases débiles, su extracción puede también ser fuertemente afectada por cambios en el pH.

Tabla 6.3: Contraiones típicos usados en extracción por pares de iones.

Ion	Estructura Química	Observaciones
Acetato	CH_3COO^-	Simple, no es muy soluble en solventes orgánicos.
Butirato	$CH_3(CH_2)_2COO^-$	Más soluble en solventes orgánicos que el acetato.
Tetrabutilamonio	$(C_4H_9)_4N^+$	Sólido
Hexadeciltributilamonio	$CH_3(CH_2)_{15}(C_4H_9)_3N^+$	Puede formar micelas.
Perfluoroctanato	$CF_3(CF_2)_6COO^-$	Puede permanecer iónico en solventes orgánicos.
Dodecanato	$CH_3(CH_2)_{10}COO^-$	Puede formar micelas.
Linolato	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}(CH_2)_7COO^-$	Puede formar cristales líquidos.
Tetrafenilboruro	$B(C_6H_5)_4^-$	Puede degradarse en varios solventes.

Adaptada de: Belter *et al.*, 1988.

Un ácido débil puede ionizarse parcialmente en agua y no ionizarse significativamente en un solvente orgánico.

El ácido débil RCOOH, en solución acuosa, se disocia de la siguiente manera:



$$\mathrm{RCOOH} \leftrightarrow \mathrm{RCOO^-} + \mathrm{H^+}$$

así que su constante de disociación K_a está dada por:

$$K_a = \frac{\left[\mathrm{RCOO^-}\right]_R \left[\mathrm{H^+}\right]_R}{[\mathrm{RCOOH}]_R} \tag{6.10}$$

Cuando este ácido débil se distribuye entre dos fases, una orgánica E y una acuosa R, el coeficiente de partición aparente agrupa las concentraciones de la forma ionizada y no ionizada del ácido en la fase acuosa. En este caso el coeficiente de partición se expresa como:

$$K_p = \frac{[\mathrm{RCOOH}]_E}{[\mathrm{RCOOH}]_R \; + \; [\mathrm{RCOO^-}]_R} \tag{6.11}$$

Combinando las ecuaciones (6.10) y (6.11) se obtiene:

$$K_p = \frac{K_i}{1 \ + \ \dfrac{K_a}{[\mathrm{H}^+]_R}} \tag{6.12}$$

donde K_i es el coeficiente de partición intrínseco de las especies no ionizadas definido por:

$$K_i = \frac{[\mathrm{RCOOH}]_E}{[\mathrm{RCOOH}]_R} \tag{6.13}$$

se sabe que $pK_a = -\log K_a$, entonces si se combinan las ecuaciones (6.12) y (6.13) se obtiene:

$$\log_{10}\left[\left(\frac{K_i}{K_p}\right) - 1\right] = pH - pK_a \tag{6.14}$$

En la Tabla 6.4 se muestran los valores de pK_a para algunos solutos de interés biológico.

El desarrollo anterior para el caso de una base débil es análogo y conduce a:

$$\log_{10}\left[\left(\frac{K_i}{K_p}\right) - 1\right] = pK_b - pH \tag{6.15}$$

Las ecuaciones (6.14) y (6.15) muestran que el coeficiente de partición puede ser alterado cambiando el pH de la solución acuosa. Los cambios en el coeficiente de partición pueden ser usados también para seleccionar el pH al que debe extraerse preferentemente un soluto determinado. Para dos soluto A y B la selectividad de la separación, β, es un indicador del grado de pureza que se puede lograr en un sistema de extracción determinado. La selectividad se puede expresar como:

$$\beta = \frac{K_p(A)}{K_p(B)} \tag{6.16}$$

$$\beta = \left(\frac{K_i(A)}{K_i(B)}\right)\left(\frac{1 \ + \ \dfrac{K_a(B)}{[\mathrm{H}^+]}}{1 \ + \ \dfrac{K_a(A)}{[\mathrm{H}^+]}}\right)$$

Ejemplo 6.1. Disociación de ácido propiónico.
El pH de una solución 0.1 M de ácido propiónico es de 2.935.
Se pide calcular:
a) La constante de disociación aparente K_a.
b) El pK_a del ácido.
c) El grado de disociación del ácido.
Solución:

Tabla 6.4: Valores de pK_a para algunos solutos biológicos.

	Compuesto			
	Bases y Ácidos Simples			
	Compuesto	pK_a		
+	Acido acético	4.76		
+	H_3PO_4	2.14		
+	$CH_3NH_3^+$	10.6		
	Aminoácidos			
	Compuesto	pK_1 COOH	pK_2 αNH_3^+	pK_3 Grupo R
+	Leucina	2.36	9.6	
+	Histidina	1.82	9.17	6.0
+	Lisina	2.18	8.95	10.53
	Péptidos			
	Compuesto	pK_1 COOH	pK_2 αNH_3^+	pK_3 Grupo R
+	Gly-Gly	3.06	8.13	
+	Ala	2.34	9.69	
+	Gly-Asp	2.81	8.60	4.45
+	Ala-Ala-Lys-Ala	3.58	8.01	10.58
	Antibióticos			
	Compuesto	$pK_a's$		
+	Cefalosporina C	3.9	5.3	10.5
+	Lincomicina (base libre)	7.6		
+	Penicilamina (carboxil)	1.8		

Adaptada de Belter, P.A. *et al*, 1988.

a) La constante de disociación de un ácido está dada por la ecuación (6.10), en este caso se tiene que:

$$K_a = \frac{[H^+]\ [CH_3 - CH_2 - COO^-]}{[CH_3 - CH_2 - COOH]}$$

dado que la concentración de la solución es de 0.1 M,



$$[CH_3 - CH_2 - COOH]\ +\ [H^+] = 0.1\ M$$

y a un pH de 2.935, la concentración de H^+ es

$$[H^+] = \frac{1}{\text{antilog}(2.935)} = 1.16 \times 10^{-3}\ M$$

de tal manera que:

$$[\mathrm{CH_3 - CH_2 - COOH}] = 9.88 \times 10^{-2}\ \mathrm{M}$$

sustituyendo en (6.10) estos resultados se obtiene:

$$K_a = \frac{(1.16 \times 10^{-3}\ \mathrm{M})\ (1.16 \times 10^{-3}\ \mathrm{M})}{9.88 \times 10^{-2}\ \mathrm{M}} = 1.36 \times 10^{-5}\ \mathrm{M}$$

b) De acuerdo con la definición de pK_a,

$$pK_a = \log\left(\frac{1}{K_a}\right) = \log\left(\frac{1}{1.36 \times 10^{-5}}\right) = 4.87$$

c) El grado de disociación es igual a la concentración de ácido disociado entre la concentración inicial de ácido, de tal manera que:

$$GD = \frac{1.16 \times 10^{-3}\ \mathrm{M}}{0.1\ \mathrm{M}} \times 100 = 1.16\,\%$$

Ejemplo 6.2. Separación de dos tipos de penicilina.

En el sistema agua-amilacetato la penicilina K y la penicilina F tienen valores de K_i de 215 y 131, respectivamente. Sus pK_a's son de 2.77 y 3.51.

Se pide: Si se desea recuperar penicilina F, determinar como se alcanza mayor pureza del producto, efectuando la extracción a pH= 3.0 o a pH=4.0.

Solución:

La selectividad de la extracción está dada por la ecuación (6.16). Para aplicar esta ecuación es necesario calcular primero K_p mediante la ecuación (6.14), para cada penicilina a cada uno de los pH's de interés.

Para la penicilina K a un pH de 3.0 se tiene:

$$\log_{10}\left[\left(\frac{K_i}{K_p(\text{“}K\text{”})}\right) - 1\right] = pH - pK_a = 3.0 - 2.77 = 0.23$$

por lo tanto:

$$K_p(\text{“}K\text{”}) = 79.68$$

Para la penicilina F a un pH de 3.0 se tiene:

$$\log_{10}\left[\left(\frac{K_i}{K_p(\text{“}F\text{”})}\right) - 1\right] = pH - pK_a = 3.0 - 3.51 = -0.51$$

por lo tanto:

$$K_p(\text{“}F\text{”}) = 100.0$$

se tiene entonces que:

$$\beta_1 = \frac{K_p(\text{“}F\text{”})}{K_p(\text{“}K\text{”})} = \frac{100.0}{79.68} = 1.26 \qquad \text{a pH} = 3$$

El cálculo de K_p para las dos penicilinas a pH=4.0 se realiza de manera similar, encontrándose para este caso que:

$$\beta_2 = 2.67$$

Los resultados obtenidos para las dos penicilinas con los pH's respectivos se muestran en la siguiente tabla:

pH	$K_p(\text{“}K\text{”})$	$K_p(\text{“}F\text{”})$	$\beta = \frac{K_p(\text{“}F\text{”})}{K_p(\text{“}K\text{”})}$
3.0	79.68	100.00	1.3
4.0	12.00	32.00	2.7

Estos resultados indican que si la extracción se realiza a un pH=4 se obtiene la penicilina F en forma más pura, aun cuando la extracción es más difícil dado que el K_p(“F”) = 32 es menor que el correspondiente al pH=3.0.

6.2.3. Selección del Solvente

En la operación de extracción generalmente es posible seleccionar el tipo de solvente que se va emplear para realizar la extracción (Mattiasson y Ling, 1989). Para tomar esta decisión es conveniente considerar las siguientes características del solvente (Tabla 6.5):

Tabla 6.5: Criterios utilizados en la selección de solventes.

Selectividad.
Coeficiente de partición adecuado para el producto.
Grado de solubilidad.
Facilidad de recuperación.
Densidad.
Tensión superficial.
Estabilidad para el soluto.
Inocuidad.

a) Selectividad. En el caso de que se desee además de concentrar lograr un cierto grado de purificación, el solvente debe ser selectivo para el soluto de interés.

b) Coeficiente de partición. Entre mayor sea el coeficiente de partición, menor es la cantidad necesaria de solvente.

c) Grado de solubilidad del solvente. Entre más insoluble sea el solvente en la alimentación, la extracción se realizará más fácilmente.

d) Facilidad de recuperación. Por cuestiones económicas es necesario que el solvente pueda ser recuperado para su reutilización.

e) Densidad. La separación de las fases una vez que se efectúa la extracción, es más rápida entre mayor sea la diferencia de densidad entre las fases.

f) Tensión superficial. Un solvente con una tensión superficial alta, facilita la coalescencia de las emulsiones en la separación de las fases.

g) Estabilidad para el soluto. El solvente no debe alterar al producto.

h) Otras. El solvente debe ser inocuo, esterilizable, no inflamable, barato y disponible en las cantidades deseadas.

6.2.4. Extracción en Dos Fases Acuosas Inmiscibles

Cuando se opera con sistemas biológicos hay un número limitado de solventes que pueden ser usados en los procesos de extracción, esto es debido a que algunas de las biomoléculas de interés como las proteínas, son desnaturalizadas por los solventes orgánicos (Shibukawa *et al.*, 2008; Mattiasson y Rajni, 1991). Una técnica de bioseparación que preserva la actividad de las biomoléculas, en este caso de las proteínas, es la extracción en sistemas de dos fases acuosas inmiscibles (SDFA).

En la Tabla 6.6 se listan algunos sistemas que pueden ser usados para formar sistemas de dos fases acuosas. En general los sistemas de dos fases acuosas se pueden clasificar en dos tipos: a) sistemas polímero-polímero y b) sistemas polímero-sal.

Tabla 6.6: Sistemas de dos fases acuosas.

Componente 1	Componente 2	Referencia
PEG	Dextrano	Albertsson (1986)
PEG	Citrato	Porto (2008)
PEG	Hidroxipropil de almidón	Tjerneld (1986)
PEG	Xantana	Chethana (2007)
PEG	Fosfato de potasio	Albertsson (1986)
PEG	Sulfato de potasio	Albertsson (1986)
Ficoll	Dextrano	Albertsson (1986)

Adaptada: Albertsson *et al.*, 1990.

Los sistemas de dos fases acuosas inmiscibles polímero-polímero se forman cuando dos polímeros como el polietilenglicol (PEG) y el dextrano se mezclan en presencia de agua. Debido al alto costo del dextrano se considera que estos sistemas son poco viables económicamente, por lo que se han considerado

sistemas alternativos como los polímero-sal (Naganagouda y Mulimani, 2008). Estos se forman por la mezcla en agua de un polímero y una sal como el fosfato de potasio. El hecho común de estos sistemas es que ambas fases son acuosas, el contenido de agua de cada fase varía entre 85 y 99 %.

Los sistemas de dos fases se caracterizan por presentar una baja tensión interfacial en el rango de 0.0001 a 0.1 dina/cm. El tiempo de sedimentación (separación de las fases) sólo por acción de la gravedad varía entre 5 min a varias horas debido a la pequeña diferencia de densidades y a la relativamente alta viscosidad entre las fases. El tiempo de separación puede reducirse utilizando centrifugación a baja velocidad (Albertsson *et al.*, 1990).

El hecho de que ambas fases sean acuosas y tengan una tensión interfacial tan pequeña, proporciona un medio ambiente tal que permite que las biomoléculas y partículas celulares puedan repartirse entre las fases conservando su actividad (Diamond y Hsu, 1990). Las células y los restos celulares generalmente se parten hacia la fase inferior o hacia la interfase.

La extracción en SDFA es un proceso sumamente atractivo para la separación de enzimas y proteínas de interés biotecnológico debido principalmente a que:

a) El escalamiento es sencillo y puede realizarse a partir de datos de laboratorio en forma confiable, dado que el coeficiente de partición no varía con la escala.

b) La transferencia de masa es alta y el equilibrio se alcanza con poca energía de mezclado.

c) Es una operación que se puede realizar en forma continua.

d) Los polímeros le confieren estabilidad a las proteínas.

e) La separación puede ser selectiva y rápida.

f) La separación puede efectuarse a temperatura ambiente debido a su rapidez.

g) Puede resultar más económica que otras operaciones.

Diagramas de fases

Los sistemas de dos fases acuosas pueden ser caracterizados mediante diagramas de fases únicos donde se grafican la composición de las fases en el equilibrio. Comúnmente, los ejes se especifican en unidades de concentración del polímero o la sal en porcentaje en peso de mezcla. En la ordenada se grafica la concentración del polímero 1 (que origina la fase superior) y en la abscisa la concentración del polímero 2 o la sal (que origina la fase inferior).

La Figura 6.3 muestra un diagrama de fases para el sistema PEG 3400/Dextrano T-5000/Agua. La curva binodal característica de estos sistemas pasa por los puntos CPD.

Características del diagrama de fases Es importante distinguir algunas características del diagrama de fases de los SDFA, como las siguientes:

a) La curva bimodal CPD separa la región de una fase localizada abajo de la curva, de la región de dos fases situada arriba de la curva. El punto A se sitúa

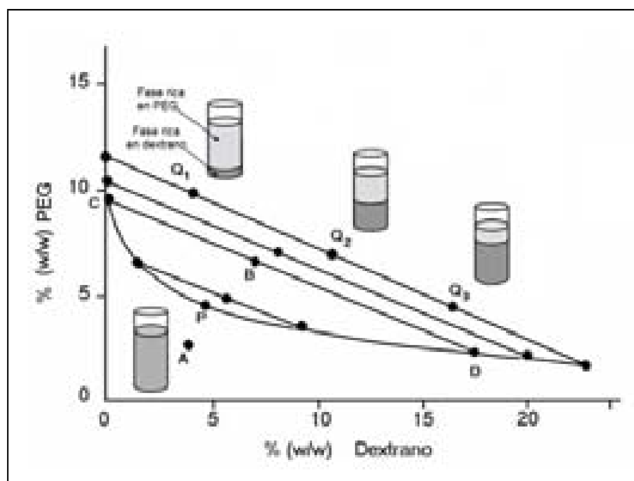


Figura 6.3: Curva binodal para un sistema de dos fases acuosas inmiscibles PEG 3400/Dextrano T-5000/Agua. Adaptada de: Huddleston *et al.*, 1991.

en una región a la izquierda de la curva binodal donde el sistema consta de una sola fase.

b) Las líneas de unión como la CBD conectan las composiciones de las fases C y D en equilibrio.

c) El punto P representa el punto crítico. Es el punto donde teóricamente la composición y los volúmenes de ambas fases son iguales.

d) El punto B se localiza en una región donde coexisten dos fases, una rica en PEG y otra rica en dextrano. Este punto representa la fracción peso de cada uno de los componentes de una mezcla formada por las fases de composición C y D.

e) Si se considera la línea de unión que pasa por los puntos Q_1, Q_2 y Q_3, todos los puntos representan la composición total de tres sistemas con diferente proporción de volumen.

Los SDFA que sean preparados con fracciones peso situadas sobre las líneas de unión, producirán sistemas de igual composición de las fases pero con diferentes volúmenes de cada fase.

Proporción de los volúmenes de las fases La proporción de volúmenes de las fases conjuntamente con el coeficiente de partición constituyen un factor de diseño fundamental de la extracción. La proporción de volúmenes de las fases puede obtenerse gráficamente utilizando balances de masa. Considérese la línea CBD de la Figura 6.3 y sea:

M: Masa total del sistema de dos fases. $[M]$.

M_E: Masa de la fase rica en PEG. $[M]$.

M_R: Masa de la fase rica en dextrano. $[M]$.
q_E: Fracción masa de PEG en fase superior (rica de PEG). [adim.].
q_R: Fracción masa de PEG en fase inferior (rica de dextrano). [adim.].
q_M: Fracción masa de PEG en la mezcla de las fases [adim.].
entonces el balance de masa total del sistema es:

$$M = M_E + M_R \tag{6.17}$$

el balance de PEG es:

$$Mq_M = M_E q_E + M_R q_R$$

combinando las dos ecuaciones anteriores se obtiene:

$$\frac{M_E}{M_R} = \frac{q_M - q_R}{q_E - q_M} \tag{6.18}$$

La diferencia de fracciones masa de la ecuación anterior puede encontrarse gráficamente en la Figura 6.3. Asimismo, por triángulos semejantes se puede demostrar que:

$$\frac{M_E}{M_R} = \frac{\overline{BD}}{\overline{\overline{BC}}} \tag{6.19}$$

donde $\overline{BD}$ y $\overline{BC}$ son las longitudes de los segmentos entre los puntos respectivos.

Cuando la densidad de las fases es muy próxima, la relación de volúmenes de las fases está dada por:

$$\frac{E}{R} = \frac{\overline{BD}}{\overline{\overline{BC}}} \tag{6.20}$$

donde E y R son los volúmenes de la fase superior e inferior, respectivamente.

Longitud de las líneas de unión La longitud de las líneas de unión es un factor de diseño y optimización importante en los SDFA. Si consideramos la línea de unión CBD, su longitud puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$LLU = \sqrt{(q_E - q_R)^2 + (p_E - p_R)^2} \tag{6.21}$$

donde:
p_E: Fracción masa de dextrano en fase superior (rica de PEG). [adim.].
p_R: Fracción masa de dextrano en fase inferior (rica de dextrano). [adim.].

Comportamiento de las fases

El comportamiento de un sistema (polímero A)-(polímero B)-(agua), depende de las interacciones entre las moleculas presentes. Estas interacciones pueden ser mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, iónicas, interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas. En un sistema pueden

presentarse simultáneamente varios tipos de estas interacciones dependiendo del tipo de polímeros que formen el sistema.

Los polímeros que se utilizan para los SDFA se caracterizan por su capacidad para formar puentes de hidrógeno con el agua, de tal manera que las interacciones (polímero A)-(polímero B) están en competencia con las interacciones (polímero A)-(agua), (polímero B)-(agua). Si las interacciones polímero-agua son más fuertes que las interacciones polímero-polímero, entonces estas últimas son menos frecuentes. En este caso se forman regiones en cada uno de los polímeros que están estadísticamente excluidas de interaccionar.

Este efecto de regiones excluidas de los polímeros produce la separación de fases en la mayoría de los sistemas de dos fases acuosas polímero-polímero. Los polímeros que se repelen debido a este efecto se denominan polímeros incompatibles. En el caso de los sistemas polímero-sal-agua la segregación de las fases se puede deber al grado de hidratación del grupo éter del PEG.

Un estado de equilibrio se caracteriza por presentar energía de Gibbs mínima a una temperatura, presión y composición dadas. En un sistema de dos fases acuosas la separación de fases ocurre en aquellas mezclas cuya energía de Gibbs es menor cuando el sistema existe como dos fases que cuando permanece como una. El criterio de equilibrio puede ser expresado también en términos de los potenciales químicos μ_i de los componentes como:

$$\mu_i^{'} = \mu_i^{''} \qquad i = 1, 2, ...N \tag{6.22}$$

donde la prima (´) y la doble prima ("), representan la fase superior y la fase inferior respectivamente, y N es el número total de componentes.

Existen varios modelos que tratan de explicar el comportamiento teórico de la partición o distribución de las proteínas en los sistemas de dos fases acuosas a partir de considerar una serie de factores que afectan la partición de este tipo de soluto en el equilibrio.

Factores que afectan al coeficiente de partición

Los estudios empíricos realizados en sistemas de dos fases acuosas han mostrado que la partición de proteínas es una función compleja que depende de factores tales como: hidrofobicidad, tamaño molecular, conformación molecular, bioespecificidad de la proteína, electroquímica, pH, concentración del buffer, fuerza iónica, temperatura y concentración de la proteína (Baskir *et al.*, 1989).

En general la partición de proteínas en sistemas de dos fases está definida por el coeficiente de partición

$$K_p = \frac{[P]_1}{[P]_2} \tag{6.23}$$

donde $[P]_1$ y $[P]_2$ son las concentraciones de soluto en las fases 1 y 2, respectivamente. Esta ecuación es equivalente a la ecuación (6.4).

Debido a la dependencia del coeficiente de partición K_p de los factores arriba mencionados, éste se puede expresar como el producto de varias contribuciones:

$$K_p = K^0 \cdot K_{\text{elq}} \cdot K_{\text{hf}} \cdot K_{\text{bioe}} \cdot K_{\text{tam}} \cdot K_{\text{conf}} \tag{6.24}$$

donde los subíndices: elq, hf, bioe, tam y conf, indican las contribuciones sobre el coeficiente de partición de las propiedades electroquímicas, hidrofóbicas, de bioespecificidad, tamaño y conformación, respectivamente, del soluto y los polímeros que forman las fases. K^0 incluye otros factores tales como la solvatación del soluto en las fases. En general, es más ilustrativo expresar el coeficiente de partición en la forma logarítmica de la ecuación (6.24) misma que se puede escribir como:

$$\ln K_p = \ln K^0 + \ln K_{\text{elq}} + \ln K_{\text{hf}} + \ln K_{\text{bioe}} + \ln K_{\text{tam}} + \ln K_{\text{conf}} \tag{6.25}$$

A continuación se describe el efecto específico de algunos de estos parámetros sobre el fenómeno de partición en dos fases acuosas (Fig. 6.4).

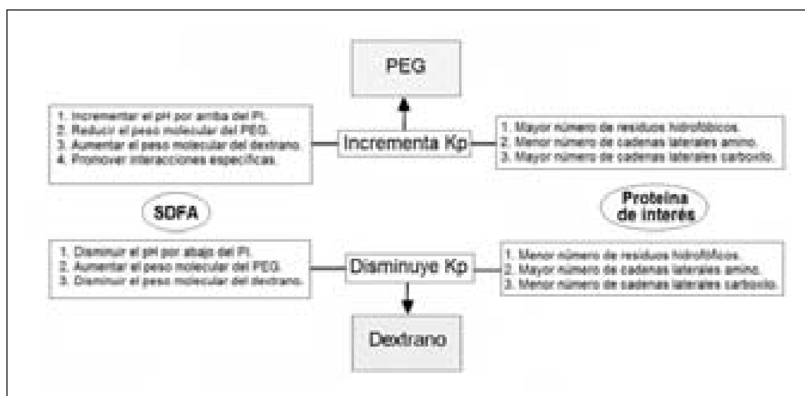


Figura 6.4: Factores que afectan al coeficiente de partición. Adaptada de: Huddleston *et al.*, 1991.

Tamaño de las biomoléculas Las moléculas pequeñas como los aminoácidos se distribuyen uniformemente entre las fases. Cuando se trata de partículas más grandes la partición no es tan uniforme, de tal manera que las proteínas grandes tienden a repartirse menos uniformemente que las proteínas pequeñas (Fig. 6.5a). Las moléculas de peso molecular muy grande como el DNA y los virus se reparten casi por completo en una sola fase. Sin embargo, las partículas extremadamente grandes como las células, se distribuyen entre la interfase y una de las fases o pueden agruparse completamente en la interfase (Baskir *et al.*, 1989).

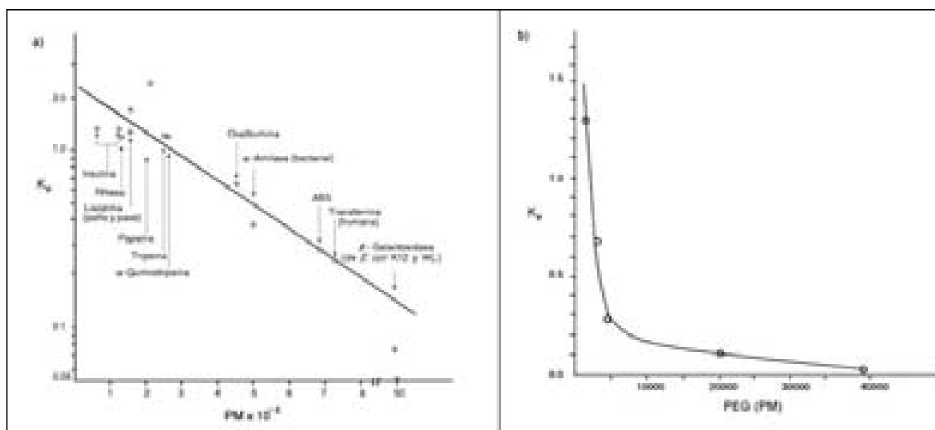


Figura 6.5: Efecto del peso molecular de los componentes sobre el coeficiente de partición. a) Tamaño del soluto en un sistema PEG 6000-dextrano 500 y b) Tamaño de los polímeros sobre la partición de una enzima. Sistema 12 % PEG y 1 % Dextrano. Fuente: Baskir, 1989.

Peso molecular de los polímeros El peso molecular de los polímeros utilizados en los sistemas de dos fases, tiene influencia sobre el reparto del biomaterial debido a que altera la composición de las fases y cambia el número de interacciones proteína-polímero (Fig. 6.5b).

El coeficiente de partición de una proteína en un sistema dextrano/polietilenglicol se incrementará si el peso molecular del polietilenglicol se reduce o el peso molecular del dextrano se incrementa. Inversamente, la partición de la proteína decrecerá si el peso molecular del polietilenglicol se incrementa o el peso molecular del dextrano se reduce.

Las proteínas con peso molecular elevado son más influenciadas por cambios en el peso molecular de los polímeros que las de peso molecular bajo. Consecuentemente, pueden utilizarse polímeros de diferente peso molecular para optimizar la separación de proteínas de diferente tamaño (Albertsson *et al.*, 1990).

Carga de la proteína Muchas proteínas y enzimas contienen un gran número de grupos cargados o que pueden cargarse en solución variando el pH. Estos grupos generalmente tienen diferentes valores de pK. Cuando el pH de la solución cambia desde valores ácidos a básicos, la proteína incrementa su carga negativa y/o reduce su carga positiva. Cuando la proteína está en su pH isoeléctrico, la suma de todas las cargas es cero. En todos los demás pH's la proteína tiene una carga neta.

Con frecuencia se observa que cuando se agregan sales a un sistema de dos fases en concentraciones entre 100 y 200 mM, se crea una diferencia de potencial

entre las fases. Ésta resulta de las preferencias de los diferentes iones de la sal por las diferentes fases lo que puede afectar fuertemente la partición de las biomoléculas cargadas .

El pH de la solución Además de los efectos del pH mencionados en el párrafo anterior, los cambios en el pH pueden inducir también cambios conformacionales en la estructura de la proteína que alteran su partición.

Concentración de la proteína Si la concentración de la proteína permanece baja (un orden de magnitud más baja que la concentración del polímero), ésta no afecta significativamente al coeficiente de partición. Sin embargo, a altas concentraciones de proteína es posible que la concentración afecte el coeficiente de partición ya que pueden alterarse significativamente las propiedades del sistema. Las proteínas pueden inclusive formar fases separadas si su concentración es suficientemente alta.

Modelos para predecir el coeficiente de partición en sistemas de dos fases

Existen varios desarrollos para obtener modelos que permitan predecir el coeficiente de partición en un sistema dado (Baskir *et al.*,1989; Clark, 1989; Jiang y Prausnitz, 2000). Los modelos reportados han sido obtenidos utilizando básicamente tres enfoques termodinámicos: integral, virial y de red (Shao *et al.*, 2009). A manera de ejemplo se presentan dos modelos a continuación.

Modelo empírico de Brönsted Uno de los modelos más sencillos para describir la partición de biomoléculas en sistemas de dos fases acuosas fue propuesto por Brönsted (Baskir *et al.*,1989). Este modelo describe en forma aproximada el efecto del tamaño de la partícula (o biomolécula) sobre el coeficiente de partición:

$$K_p = \exp\left(\frac{M\lambda}{\kappa T}\right) \tag{6.26}$$

donde:
M: Peso molecular de la partícula que se particiona. [g/mol].
κ: Constante de Boltzmann. ($1.3806568 \times 10^{-23}$J °K^{-1}).
T: Temperatura absoluta. (°K).
λ: Parámetro agrupado sobre la influencia de las fases y la partícula.

La ecuación (6.26) muestra la influencia del tamaño del soluto y la temperatura sobre el coeficiente de partición, la influencia de los factores restantes los agrupa en el parámetro λ.

Modelo termodinámico molecular El modelo termodinámico molecular (virial) está basado en la teoría de soluciones de McMillan-Mayer. En este modelo el agua se considera un medio continuo. Las interacciones entre los solutos

y el medio se representan por un potencial de fuerza media (Jiang y Prausnitz, 2000). El modelo ha sido propuesto para la partición de proteínas nativas y desnaturalizadas:

$$ln\ (K_p) = ln\ \left(K_p^0\right) + \frac{Z_p F \Delta\Phi}{RT} \tag{6.27}$$

donde:
K_p: Coeficiente de partición.
K_p^0: Coeficiente de partición cuando el gradiente de potencial es cero.
Z_p: Carga de la proteína.
F: Constante de Faraday, 96,487 C/equiv.
$\Delta\Phi$: Diferencia de potencial elecrostático entre la fase inferior y la fase superior.
R: Constante de los gases ideales.
T: Temperatura absoluta.

Estrategias heurísticas El desarrollo y optimización de procesos de recuperación que utilizan SDFA requiere realizar un buen número de experimentos, para asegurar un buen rendimiento y pureza del producto de interés. La metodología de la superficie de respuesta es comúnmente empleada en estos estudios (Azevedo *et al.*, 2007), pero puede requerir recursos significativos. Recientemente, han sido presentadas algunas reglas y estrategias heurísticas para facilitar este tipo de trabajos (Benavides y Rito-Palomares, 2008). Las estrategias se dividen en:

a) Caracterización fisicoquímica del caldo a procesar. Los principales parámetros son el peso molecular del soluto, el punto isoeléctrico y su hidrofobicidad. Esta información se establece en base a reportes de la literatura y mediante experimentación.

b) Selección del tipo de SDFA. Los sistemas polimero-sal (particularmente PEG-fosfato) son altamente recomendados como punto de partida debido a que son menos costosos, están bien caracterizados y por su estabilidad.

c) Selección de los parámetros del sistema. El pH, el peso molecular del polímero y el diagrama de fases del sistema requieren ser establecidos. Se recomienda trabajar a un pH ligeramente superior al punto isoeléctrico o pK del soluto. Los sistemas PEG-fosfato son recomendados para trabajar a pH$\geq$7.0 y los sistemas PEG-sulfato a pH$<$6.5.

Una vez seleccionado el SDFA es necesario construir el diagrama de fases del sistema. Se sugiere investigar la influencia del peso molecular del polímero sobre la longitud de las líneas de unión, manteniendo el pH constante y la relación de volúmenes de las fases $E/R = 1$. Se recomienda usar polímeros de bajo peso molecular y LLU bajas o medias, para la recuperación de compuestos hidrofílicos de alto peso molecular ($>$10,000 g/mol). Por lo contrario, utilizar polímeros de alto peso molecular y LLU medias o altas para recuperar solutos hidrofóbicos de bajo peso molecular.

d) Evaluación de la influencia de los parámetros de proceso sobre el rendimiento y la pureza del producto. Se sugiere evaluar la influencia de la cantidad de

caldo a procesar, la adición de sales neutras o sustancias químicas, el número de etapas de recuperación y la geometría del sistema. La cantidad de caldo recomendada es entre 10 y 40 % en peso. Puede investigarse el efecto de la adición de sales como NaCl en concentraciones entre 0.25 y 2.0 M sobre el rendimiento y la pureza. Finalmente, se recomienda hacer un estudio sobre el efecto y costo del uso de más de una etapa, así como del efecto de la geometría del sistema (H/D) sobre la cinética de la separación de las fases.

6.3. Equipo de Extracción

Existen varios tipos de equipos para realizar una operación de extracción (Tabla 6.7). De acuerdo a la forma en que estos equipos pueden ser operados se dividen en extractores por lotes y extractores continuos. A su vez los equipos de operación continua pueden ser de contacto por etapas o de contacto diferencial.

Otra característica de los equipos de extracción es la forma en que las fases se separan una vez realizada la extracción, lo cual puede realizarse sólo por gravedad o por medio de una fuerza centrífuga. En los equipos de extracción el control del tamaño de las gotas de la fase dispersa puede realizarse por medio de agitación mecánica o por pulsaciones. En esta sección se presentan algunos equipos de extracción agrupándolos en: a) extractores por lotes y b) extractores continuos.

Tabla 6.7: Clasificación y ejemplos de equipos de extracción.

		Equipo		
Dinámica		Intermitente	Continuo	
Separación de las fases por:	Tamaño de gotas por:		Etapas múltiples	Columnas de contacto diferencial
Gravedad	Agitación	$M - S^*$		
Gravedad	Agitación		M-S	
Gravedad	Gravedad			Aspersión
Gravedad	Gravedad		Platos perforados	
Gravedad	Agitación			Lecho empacado
Gravedad	Agitación			Aspersión tipo Rushton-Oldshue
Gravedad	Agitación			Discos giratorios
Gravedad	Pulsos			Tipo Karr platos y empacadas
Centrífuga	Deflectores	Westfalia y Robatel	Podbielniak y Alfa Laval	

* M-S Mezclador-Sedimentador

6.3.1. Equipo de Extracción por Lotes

En la extracción por lotes o de una etapa, la solución que contiene el soluto de interés se mezcla con el solvente y posteriormente las fases se separan. En la

Figura 6.6 se muestran algunos de los equipos utilizados para este tipo de extracción. En la Figura 6.6(a) se muestra un mezclador sedimentador típico donde el mezclador o agitador está completamente separado del sedimentador. Las fases se alimentan al mezclador y posteriormente se separan en el sedimentador. En la Figura 6.6(b) se muestra una combinación de mezclador-sedimentador. Los mezcladores sedimentadores pueden combinarse en serie para extracción en etapas múltiples o a contracorriente.

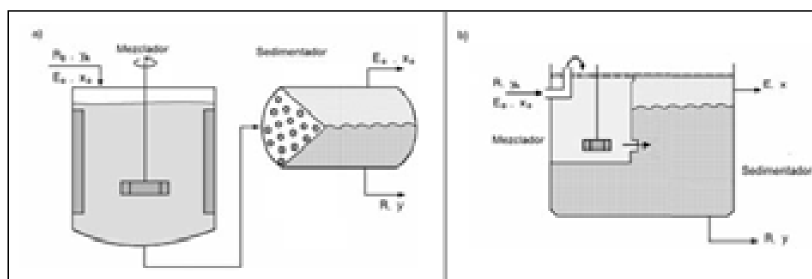


Figura 6.6: Esquema de equipos utilizados en la extracción intermitente: a) Mezclador-sedimentador separado; b) Mezclador-sedimentador integrado.

Para obtener una transferencia de masa eficiente, con frecuencia se usa un mezclador mecánico que proporciona un contacto íntimo entre las dos fases líquidas. En general una de las fases se dispersa en la otra en forma de gotas pequeñas y debe existir un tiempo de contacto suficiente para que se realice la extracción. En el diseño del equipo hay un compromiso: si los dos líquidos son mezclados intensamente formarán gotas pequeñas las cuales permitirán una extracción rápida pero una separación lenta; si los líquidos son mezclados ligeramente se formarán gotas grandes, habrá menos área de contacto, la extracción es lenta, pero la separación más rápida.

6.3.2. Equipo de Extracción Continua

Básicamente existen dos tipos de equipos para realizar extracciones en forma continua: a) equipos continuos de etapas múltiples y b) equipos continuos de contacto diferencial.

Equipo de extracción de etapas múltiples

Los equipos utilizados en operaciones de extracción de etapas múltiples varía ampliamente, pero todas las modalidades involucran extracciones por lotes repetidas. En la Figura 6.7 se muestra un sistema de este tipo donde el flujo de alimentación y solvente se suministran a contracorriente en una serie de mezcladores-sedimentadores.

El tamaño del mezclador debe dimensionarse para proporcionar suficiente agitación y tiempo de contacto para lograr el equilibrio entre las fases. Este de-

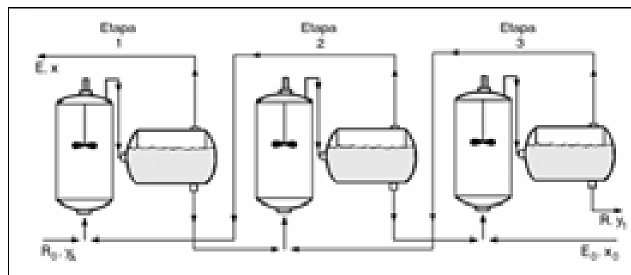


Figura 6.7: Mezcladores sedimentadores conectados a contracorriente en etapas múltiples.

penderá del flujo a ser procesado y de las propiedades físicas de ambos líquidos. Cuando la extracción involucra reacciones químicas el tiempo de contacto puede ser muy importante. Algunos extractores de etapas múltiples como los Westfalia y los Robatel emplean fuerzas centrífugas para separar las fases durante la extracción.

Equipo de extracción diferencial

Las columnas de extracción empacadas y las de aspersión, proporcionan contactos diferenciales donde el mezclado y la sedimentación se suceden en forma continua y simultánea.

En la Figura 6.8 se puede observar que en una columna de aspersión el líquido pesado entra por la parte superior y llena la columna formando la fase continua y sale por el fondo. El líquido ligero entra a través de un distribuidor de tovera en el fondo, mismo que lo dispersa hacía arriba en forma de gotas muy pequeñas. El líquido ligero se coliga o junta en la parte superior y sale. En algunos casos el líquido pesado se dispersa hacia abajo sobre la fase ligera continua que se va elevando. Tanto el líquido pesado como el líquido ligero se pueden introducir dentro de la columna como la fase dispersa. Las columnas de aspersión presentan por regla general bajas eficiencias debido al poco mezclado y como consecuencia su uso es reducido en la industria.

El contacto entre las fases puede mejorarse proporcionando una superficie mayor. Esta superficie es proporcionada al rellenar la columna con un empaque como los anillos de Rasching o las sillas de Berl. Estos empaques promueven la unión de las gotas y la redispersión de las mismas a intervalos frecuentes a lo largo de la columna. Evidentemente en este tipo de columnas se pierde capacidad debido al espacio que ocupa el empaque, sin embargo esto se ve compensado por la gran mejoría que se tiene en la transferencia de masa.

Las columnas empacadas tienen una eficiencia mayor que las de aspersión, misma que puede incrementarse aplicando una pulsación oscilante a los fluidos contenidos en la columna. En la Figura 6.9 se presentan esquemas de tres diferentes tipos de columnas de extracción.

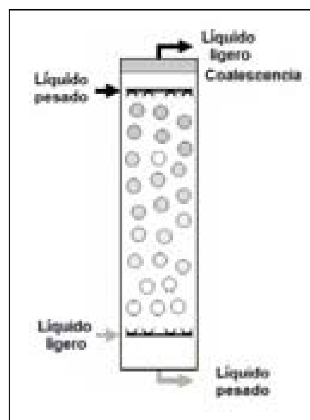


Figura 6.8: Esquema de una columna de extracción por aspersión.

La columna de platos perforados proporciona un método seguro y eficiente en los procesos de extracción líquido-líquido. El esquema de la Figura 6.10 muestra los platos perforados donde se dispersan las gotas del líquido ligero que tienden a elevarse. Las gotas dispersadas se juntan debajo de cada plato y vuelven a formarse por encima de éste al pasar a través de las perforaciones. El líquido pesado fluye hacia abajo de los platos donde se pone en contacto con las gotas y después pasa hacia el plato inferior.

Al igual que en las columnas empacadas, la eficiencia de separación en las columnas con platos perforados puede incrementarse mediante vibraciones o acciones reciprocantes verticales que promueven la coalición y dispersión de la fase dispersa. Las columnas Karr son de las más utilizadas en biotecnología y operan de esta manera. La longitud del movimiento varía entre 3 y 50 mm y la frecuencia reciprocante puede alcanzar hasta 1000 ciclos/min (Karr, 1980). Las ventajas de estas columnas incluyen una alta eficiencia de extracción, bajo consumo de potencia, dispersión axial baja y un alto flux. (Stella *et al.*, 2008).

Algunos equipos de extracción diferencial utilizan la fuerza centrífuga para el manejo de las fases como el extractor Podbielniak y el extractor Alfa Laval. Estos equipos son muy utilizados en la producción de antibióticos. Ofrecen tiempos de contacto cortos para materiales inestables, requieren poco espacio de piso y pueden manejar emulsiones y sistemas con $\Delta\rho$ bajas.

6.4. Diseño de Equipo de Extracción

Esta sección se centra en los aspectos relevantes del diseño de equipo de extracción considerando tres modos para realizar la operación que son de interés en bioseparaciones:

- Extracción por lotes.

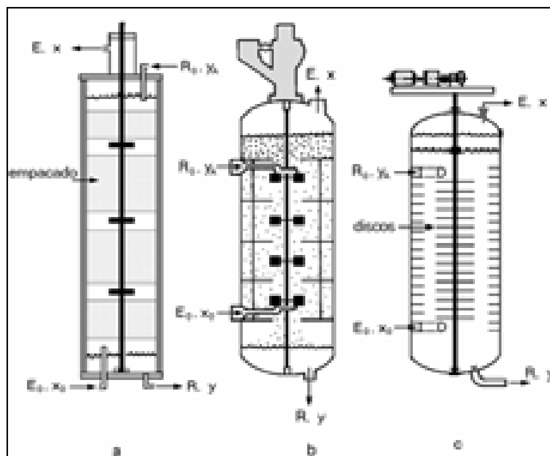


Figura 6.9: Columnas de extracción: a) Lecho empacado b) Aspersión tipo Rushton-Oldshue y c) Discos giratorios.

- Extracción continua.
- Extracción fraccionaria.

6.4.1. Extracción por Lotes

La extracción por lotes, también llamada extracción de una sola etapa, consiste en poner en contacto íntimo la solución a tratar con el solvente de extracción y formar dos fases. Después de este contacto y una vez que se ha alcanzado el equilibrio, las fases deben separarse. En este proceso es conveniente que el contacto se realice con un alto grado de turbulencia para obtener altas velocidades de transferencia de masa.

El proceso de extracción en una sola etapa se presenta en la Figura 6.11. El separador está incluido en la etapa debido a que la extracción del soluto persiste en tanto las dos fases se encuentren en contacto y hasta que se alcance el equilibrio.

Existen dos métodos para el cálculo de extractores por lotes que dependen de la información disponible y de la complejidad de ésta: a) el analítico y b) el gráfico.

Método analítico: Extractores por lotes

El rendimiento alcanzado en una operación de extracción es un factor de diseño importante y puede ser obtenido mediante el cálculo de la concentración final del soluto de interés en las fases. Como generalmente la extracción se realiza de tal manera que las fases interactúan hasta alcanzar el equilibrio, la

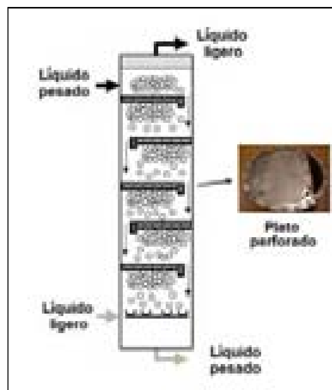


Figura 6.10: Esquema de una de una columna de extracción de platos perforados.

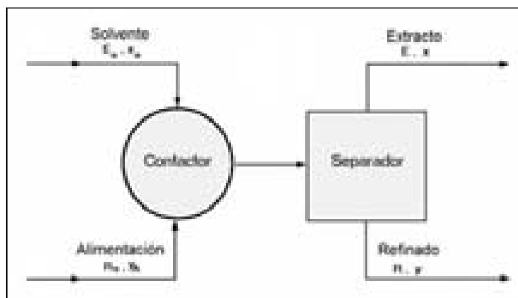


Figura 6.11: Esquema de un proceso de extracción en una sola etapa.

concentración final del soluto puede ser obtenida en algunos casos en forma analítica mediante el empleo de dos ecuaciones.

La primera de ellas es una relación de equilibrio para las soluciones que intervienen en el proceso y la segunda es un balance de masa para el soluto. Cuando la relación de equilibrio es lineal se tiene:

$$x = Ky \tag{6.28}$$

donde:

x: Concentración del soluto en la fase ligera E.

y: Concentración del soluto en la fase pesada R.

K: Constante de equilibrio.

La ecuación (6.28) es la ecuación de una recta que pasa por el origen.

La segunda relación es un balance de masa que establece que en el proceso de extracción:

$$\text{Cantidad de soluto inicial} = \text{Cantidad soluto final}$$

El balance de masa para el soluto, referido a la Figura 6.11 es:

$$R_o y_A \ + \ E_o x_o = Ry \ + \ Ex \tag{6.29}$$

donde:

y_A: Concentración de soluto en la alimentación o fase pesada.

y: Concentración de soluto en el refinado, esto es, la concentración del soluto que permanece en la alimentación después de la extracción.

x_o: Concentración inicial de soluto en el solvente de extracción y generalmente es igual cero.

x: Concentración de soluto en el extracto al final de la operación.

Las unidades de concentración pueden estar en % en peso, fracción mol o masa/volumen (E y R en unidades consistentes). En este desarrollo se supone que E y R son constantes.

Para encontrar una expresión para calcular la concentración al final de la extracción o de equilibrio, se sustituye el valor de x dado por la ecuación (6.28) en la ecuación (6.29). El valor para y se obtiene de manera similar. Esta combinación de ecuaciones conduce a:

$$x = \frac{K y_A}{1 \ + F} \tag{6.30}$$

$$y = \frac{y_A}{1 \ + F} \tag{6.31}$$

donde F es el factor de extracción y está dado por:

$$F = \frac{KE}{R} \tag{6.32}$$

El factor de extracción reúne dos factores de diseño importantes, la constante de equilibrio y la relación de las fases.

Es posible desarrollar una expresión para calcular el rendimiento de la operación o la fracción extraída p, definida por:

$$p = \frac{Ex}{R y_A} \tag{6.33}$$

misma que puede ser escrita en términos del factor de extracción para dar:

$$p = \frac{F}{1 \ + F} \tag{6.34}$$

Consecuentemente la fracción de producto no recuperado es igual a uno menos la fracción extraída. Las expresiones desarrolladas son diferentes en el caso que la extracción se realice de la fase ligera a la pesada.

Ejemplo 6.3. Cálculo de la fracción extraída de un producto proveniente de un caldo de fermentación.

En la recuperación de productos de fermentación con frecuencia se emplean extractores agitados. En este caso se ponen en contacto 10.0 L de un caldo de fermentación acuoso que contiene 10 g/L del producto que quiere extraerse, con 1.0 L de un solvente orgánico.

Se pide: Si el coeficiente de distribución es igual a 20 y se alcanza el equilibrio en el extractor, calcular la fracción extraída de producto.

Solución:

El esquema que representa el sistema de extracción es similar al de la Figura 6.11. El balance de masa para el soluto en este sistema es:

$$R_o y_A \; + \; E_o x_o = Ry \; + \; Ex$$

como inicialmente en el solvente de extracción la concentración del producto es cero, el balance de masa del soluto queda como:

$$R_o y_A = Ry \; + \; Ex \qquad\qquad (a)$$

combinando la ecuación anterior con la ecuación de equilibrio $x = Ky$ y suponiendo $R_o = R$, se obtiene la concentración del soluto en el solvente de extracción en el equilibrio. Esta concentración está dada por:

$$x = \frac{Ky_A}{1 \; + \; F} \qquad \text{con} \qquad F = \frac{KE}{R}$$

sustituyendo los datos del problema se tiene:

$$F = \frac{KE}{R} = \frac{20 \text{ L}}{10 \text{ L}} = 2$$

la concentración x es:

$$x = \frac{Ky_A}{1 \; + \; F} = \frac{20 \times (10 \; \frac{\text{g}}{\text{L}})}{1 \; + \; 2} = 66.6 \; \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

y la fracción extraída p es:

$$p = \frac{F}{1 \; + \; F} = \frac{2}{1 \; + \; 2} = 0.666$$

después de la extracción el porcentaje del producto en el extracto es de 66.6 % y en el refinado es de 33.3 %. Si se desea extraer casi todo el producto se deberán realizar más etapas de contacto entre las fases o aumentar el volumen del solvente de extracción.

Ejemplo 6.4. Sistema de dos fases acuosas para separar virus.

Se emplea un sistema de extracción de dos fases acuosas para separar y concentrar virus de un caldo biológico. El volumen inicial V_o de la solución que contiene los virus es de 3×10^{-3} m^3 y el volumen inicial V de la solución de

polímeros es de 1×10^{-4} m^3. El coeficiente de partición K_p es de 4×10^{-4}. Una vez que se mezclan ambas soluciones el volumen R de la fase pesada formada es de 5×10^{-5} m^3.

Se pide estimar:

a) Las veces que se concentró la solución o grado de concentración obtenido.

b) El rendimiento de la operación.

Solución:

a) El grado de concentración GC puede ser expresado como:

$$GC = \frac{y}{C_o}$$

donde C_o es la concentración de partículas en la solución original.

Mediante un balance de virus se puede obtener la siguiente expresión:

$$V_oC_o = xE + yR$$

combinando ambas expresiones se obtiene:

$$GC = \frac{V_o\ y}{xE + yR} = \frac{V_o}{R(1+F)}$$

donde:

$$F = \frac{K_pE}{R}$$

Para utilizar la ecuación anterior es necesario calcular primero el valor de E mediante un balance,

$$V_o + V = E + R$$

entonces,

$$\begin{aligned} E &= V_o + V - R \\ E &= (3 \times 10^{-3} + 1 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-5})\ m^3 = 3.05 \times 10^{-3}\ \text{m}^3 \end{aligned}$$

y el grado de concentración es:

$$GC = \frac{3 \times 10^{-3}\ \text{m}^3}{(5 \times 10^{-5}\ \text{m}^3)\left[1 + \dfrac{(4 \times 10^{-4}) \times (3.05 \times 10^{-3}\ \text{m}^3)}{5 \times 10^{-5}\ \text{m}^3}\right]} = 58.57$$

b) El rendimiento de la operación puede expresarse como:

$$p = \frac{y\ R}{C_oV_o}$$

combinando la expresión anterior con la del balance de virus se obtiene:

$$p = \frac{yR}{xE + yR}$$

y en términos del grado de concentración:

$$p = (GC)\left(\frac{R}{V_o}\right) = (58.57) \times \left(\frac{5 \times 10^{-5}\ \mathrm{m}^3}{3 \times 10^{-3}\ \mathrm{m}^3}\right) = 0.976$$

Método gráfico: Extractores por lotes

En la solución de problemas de extracción por lotes se emplean con mucha frecuencia métodos gráficos, los cuales son útiles en situaciones en las que el equilibrio es complejo y no se ajusta a una relación lineal como la ecuación (6.28). Al igual que el método analítico el método gráfico también depende de dos ecuaciones básicas: una relativa al equilibrio y otra al balance de masa del soluto.

La relación de equilibrio establece que la concentración x del soluto en el solvente de extracción después de que las fases se ponen en contacto, es una función que depende de la concentración y del soluto en el refinado,

$$x = f(y) \tag{6.35}$$

De acuerdo con la Figura 6.11, la ecuación para el balance de masa del soluto (solvente libre de soluto) es:

$$R_o y_A = Ry + Ex$$

consecuentemente:

$$x = \left(\frac{R}{E}\right)(y_A - y) \tag{6.36}$$

La ecuación anterior es la de una recta llamada línea de operación cuya pendiente es $m = -R/E$ y cuya ordenada al origen es $b = Ry_A/E$

Si se grafican los datos de equilibrio (ya sea en forma de una ecuación o de datos tabulados) y la línea de operación como se muestra en la Figura 6.12, en la intersección de las curvas se obtienen los valores de equilibrio y y x.

Ejemplo 6.5. Extracción de un aminoácido.

La relación de equilibrio entre el tolueno y el agua pura en la extracción de un aminoácido no esencial está dada por:

$$x^2 = (0.001\ M)(y)$$

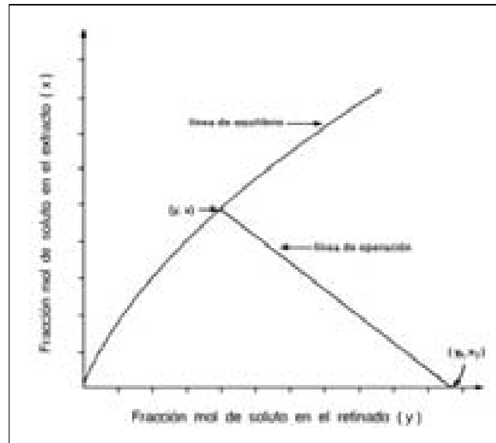


Figura 6.12: Extracción intermitente. En la intersección de la línea de operación con la de equilibrio se obtienen las concentraciones que se alcanzan al final de la operación.

Se pide: Estimar la fracción de aminoácido extraída al poner en contacto 4.7 L de solución de tolueno, con una concentración 0.006 M del aminoácido, con 1.0 L de agua.

Solución:

El esquema del proceso se presenta en la Figura 6.13:

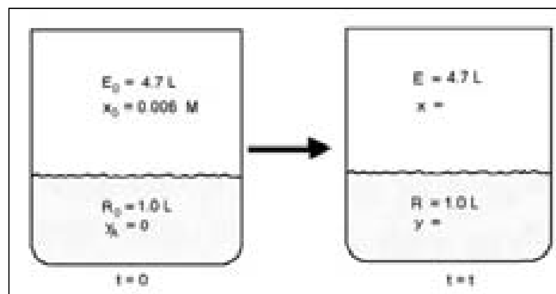


Figura 6.13: Esquema de la extracción de un aminoácido en un sistema intermitente tolueno-agua. Ejemplo 6.5.

El balance de masa para el aminoácido es:

$$R_o y_A + E_o x_o = Ry + Ex$$

de tal manera que la expresión de la línea de operación está dada por:

$$y = \frac{E}{R}(x_o \ - \ x)$$

sustituyendo valores se obtiene:

$$y = 4.7(0.006 \ - \ x)$$

En la Figura 6.14 se muestra la curva de equilibrio y la línea de operación para este sistema. En la intersección de estas dos líneas se puede encontrar la concentración y de soluto al final de la extracción. Esta concentración en el equilibrio es:

$$y \ = \ 0.012 \ M$$

la fracción extraída p es:

$$p = \frac{Ry}{Ex_o} = \frac{(1.0 \ L) \ (0.012 \ M)}{(4.7 \ L) \ (0.006 \ M)} = 0.43$$

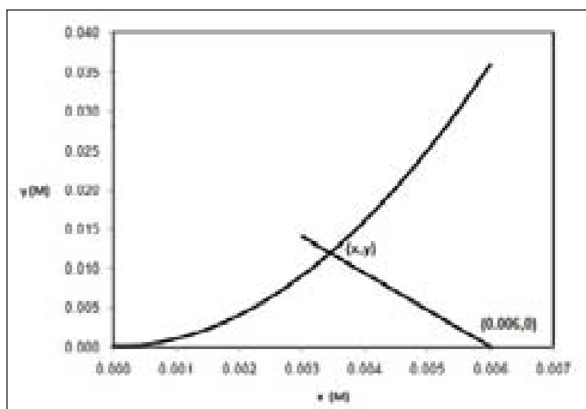


Figura 6.14: Curva de equilibrio y línea de operación para el sistema tolueno-agua. Ejemplo 6.5.

6.4.2. Extracción Continua

El tratamiento del diseño de extractores continuos puede dividirse en: a) extracción en etapas múltiples y b) extracción diferencial. A continuación se revisan cada una de ellas.

Extracción en etapas múltiples

En la extracción por lotes se usa una sola etapa para transferir el soluto de la fase acuosa a la fase ligera. Para transferir más soluto puede repetirse el contacto mezclando la corriente de salida de refinado con disolvente nuevo. De esta manera se logra un mayor porcentaje de extracción del soluto, sin embargo este procedimiento emplea una mayor cantidad de solvente y da lugar a la formación de corrientes muy diluidas. Para emplear menos solvente y obtener una corriente de extracto de salida más concentrada, generalmente se usa un contacto a contracorriente en etapas múltiples como el que se muestra en la Figura 6.15.

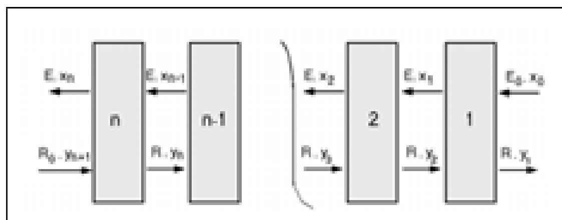


Figura 6.15: Esquema de un proceso de extracción a contracorriente en etapas múltiples.

En este esquema cada etapa está identificada por un número, iniciando con el número 1 a la derecha. La solución pesada R_o (alimentación) entra a la cascada por la parte inferior izquierda y el solvente puro o fase ligera E_o entra por la parte superior derecha.

Las concentraciones de las fases a la salida de cada etapa son las correspondientes al equilibrio. Por ejemplo, el líquido ligero que deja la primera etapa tiene una concentración de equilibrio x_1 con y_1. El líquido pesado que deja la segunda etapa tiene una concentración de equilibrio y_2.

Dos métodos son comúnmente utilizados para analizar este tipo de operaciones: a) el analítico y b) el gráfico.

Método analítico: Extractores continuos multietapas El rendimiento alcanzado en una operación de extracción es un factor de diseño importante y puede ser obtenido mediante el cálculo de la concentración final del soluto de interés en las fases. Debido a que generalmente la extracción se realiza de tal manera que las fases interactúan hasta alcanzar el equilibrio, la concentración final del soluto puede ser obtenida en algunos casos en forma analítica, mediante el empleo de dos ecuaciones: una relación de equilibrio y un balance de masa.

Cuando el equilibrio puede ser expresado por una relación lineal, para la etapa n se tiene:

$$x_n = Ky_n \tag{6.37}$$

El balance de masa para el soluto en estado estacionario debe realizarse en cada etapa. De acuerdo a la Figura 6.15 dicho balance para la primera etapa es:

$$Ry_2 \ + \ E_o x_o = Ry_1 \ + \ Ex_1 \tag{6.38}$$

Cuando las concentraciones de las corrientes de salida de cada etapa son las de equilibrio y el solvente está libre de soluto $x_o = 0$, las ecuaciones (6.37) y (6.38) se combinan para obtener:

$$y_2 = (1 \ + \ F)\,(y_1) \tag{6.39}$$

como se mencionó anteriormente $F = KE/R$ es el factor de extracción.

Para la segunda etapa el balance de masa es:

$$Ry_3 \ + \ Ex_1 = Ry_2 \ + \ Ex_2 \tag{6.40}$$

y de acuerdo a la relación de equilibrio, $x_1 = Ky_1$ y $x_2 = Ky_2$ de tal manera que:

$$y_3 = (1 \ + \ F)\,(y_2) - Fy_1$$

combinando la ecuación anterior con la ecuación (6.39) se obtiene:

$$y_3 = (1 \ + \ F \ + \ F^2)\,(y_1) \tag{6.41}$$

mediante este procedimiento se puede obtener una expresión para el cálculo de la concentración de soluto en la fase pesada a la salida en función de la concentración a la entrada, el factor de extracción y el número de etapas, de la forma:

$$y_{n+1} = (1 \ + \ F \ + \ F^2 \ + \ ... \ + \ F^n)\,(y_1) \tag{6.42}$$

que también puede escribirse como:

$$y_{n+1} = \left(\frac{F^{n+1} \ - \ 1}{F \ - \ 1}\right)(y_1) \tag{6.43}$$

La ecuación (6.43) puede ser utilizada de varias formas:

a) Si se conoce la concentración de la alimentación y_{n+1}, el factor de extracción F y el número de etapas n, entonces se puede calcular la concentración del soluto a la salida y_1, y por lo tanto la fracción extraída.

b) Si se conoce la concentración de soluto a la entrada en la corriente de alimentación y la concentración deseada a la salida y el factor de extracción F, entonces se puede calcular el número de etapas necesarias para el proceso de extracción.

c) Si se conoce la fracción que no es extraída y_1/y_{n+1} y el número de etapas, se puede conocer el factor de extracción F; esto permite seleccionar flujos adecuados para E y R.

El cálculo de las concentraciones de salida permite estimar el rendimiento o la fracción extraída p, que en este caso está dado por:

$$p = \frac{Ex_n}{Ry_{n+1}}$$

combinando la ecuación anterior con las ecuaciones (6.37) y (6.43) se obtiene,

$$p = \frac{(F)\,(F^n \; - \; 1)}{F^{n+1} \; - \; 1} \tag{6.44}$$

De la ecuación (6.44) se desprende que cuando F es muy grande, p se aproxima a 1. Por otro lado, cuando F tiende a cero también p tiende a cero.

En el caso particular cuando F es igual a la unidad,

$$y_{n+1} = (1 \; + \; 1 \; + \; 1^2 \; + \; ... \; + \; 1^n)\,(y_1) = (n+1)y_1$$

$$p = \frac{Ry_{n+1} - Ry_n}{R_{yn+1}} = \frac{(n+1)y_1 - y_1}{(n+1)y_1} = \frac{n}{n+1}$$

Ejemplo 6.6. **Cálculo de la fracción extraída de un producto proveniente de un caldo de fermentación en una extracción por etapas.**

En una operación de extracción a contracorriente se ponen en contacto 10.0 L/min de un caldo de fermentación acuoso que contiene 10 g/L del producto que se desea extraer, con un flujo de 1.0 L/min de un solvente orgánico.

Se pide: Si la constante de equilibrio es de 20 y se establece el equilibrio en cada etapa del extractor, calcular la fracción extraída de producto en un sistema de extracción de tres etapas.

Solución:

De acuerdo a los datos, $y_{n+1} = 10$ g/L; $K = 20$; $R = 10.0$ L/min; $E = 1.0$ L/min y $n = 3$.

La fracción extraída puede ser obtenida mediante la ecuación (6.44), para lo cual es necesario calcular primero el factor de extracción, entonces:

$$F = \frac{EK}{R} = \frac{1.0\,\dfrac{\text{L}}{\text{min}} \times 20}{10.0\,\dfrac{\text{L}}{\text{min}}} = 2$$

la fracción extraída o recuperada en el solvente de extracción es:

$$p = \frac{F(F^n \; - \; 1)}{F^{n+1} \; - \; 1} = \frac{2 \times (2^3 \; - \; 1)}{2^4 \; - \; 1} = 0.93$$

Ejemplo 6.7. Extracción continua de penicilina.

Se extrae penicilina de un caldo de fermentación utilizando isoamilacetato como solvente orgánico en un arreglo tipo cascada a contracorriente. Los flujos de la fase orgánica y de la fase acuosa son $E = 10$ L/min y $R = 100$ L/min, respectivamente. El coeficiente de partición de la penicilina a pH=3 es $K = 50$.

Se pide: Si la concentración de penicilina en la alimentación es de 20 g/L, calcular el número de etapas necesarias para obtener una concentración de 0.1 g/L de penicilina en la corriente de salida.

Solución:

El número de etapas puede ser calculado mediante la ecuación (6.43), para lo cual es necesario calcular primero el factor de extracción,

$$F = \frac{KE}{R} = \frac{50 \times 10 \ \frac{\text{L}}{\text{min}}}{100 \ \frac{\text{L}}{\text{min}}} = 5$$

el número de etapas puede obtenerse mediante la expresión:

$$\begin{aligned} \frac{y_{n+1}}{y_1} &= \left(\frac{F^{n+1} - 1}{F - 1}\right) \\ \frac{20 \ \frac{g}{L}}{0.1 \ \frac{g}{L}} &= \frac{5^{n+1} - 1}{5 - 1} \\ n &= 3.15 \simeq 4 \end{aligned}$$

Método Gráfico: Extracción continua de etapas múltiples Al igual que en la extracción por lotes, los métodos gráficos son muy usados en ingeniería en la solución de problemas de extracción por etapas (en equilibrio y estado estacionario). Se requieren dos tipos básicos de relaciones: una relación de equilibrio y un balance de masa.

La relación de equilibrio se expresa como:

$$x_n = f(y_n) \tag{6.45}$$

El balance de masa global para el soluto, es decir en todo el equipo, es de la forma:

$$x_n = \frac{R}{E}(y_{n+1} \ - \ y_1) \tag{6.46}$$

las ecuaciones (6.45) y (6.46) pueden graficarse sobre el mismo plano coordenado para obtener las líneas de equilibrio y operación, respectivamente. En la Figura 6.16 se muestra una gráfica de este tipo.

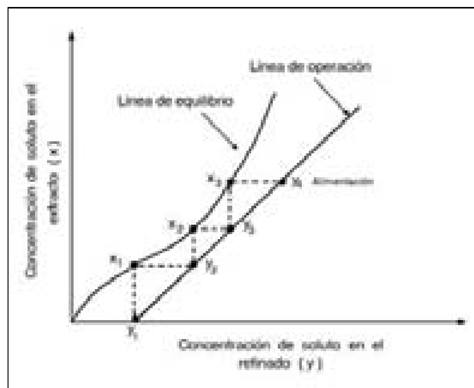


Figura 6.16: Análisis gráfico de una extracción a contracorriente en etapas múltiples.

Cuando interesa calcular el número de etapas n requeridas en una operación de extracción, una vez trazada la curva de equilibrio y la de operación, el procedimiento es el siguiente (Fig. 6.16).

a) Se calcula la concentración de soluto en la fase pesada en la parte final de la cascada y_1, mediante la ecuación (6.46).

b) Se localiza sobre la gráfica el punto (y_1, $x = 0$). Este punto representa la intersección de la línea de operación con el eje de las abscisas.

c) Una vez localizado el punto (y_1, $x = 0$), se traza una línea vertical en y_1.

d) En la intersección de la línea vertical con la curva de equilibrio se localiza el punto (y_1, x_1) de la línea de equilibrio.

e) En x_1 se traza una línea horizontal.

f) En la intersección de la línea horizontal con la línea de operación se localiza el punto (y_2, x_1).

g) Se repite el procedimiento anterior hasta alcanzar el punto (y_{n+1}, x_n). En este punto la concentración del soluto en el refinado iguala o excede la concentración en la alimentación.

h) El número de etapas se determina contando el número de escalones trazados.

Ejemplo 6.8. **Extracción por etapas de Actinomicina D.**

Se desea extraer Actinomicina D de un caldo de fermentación que contiene 260 mg/L de este antibiótico, utilizando butil-acetato como solvente. La constante de equilibrio K de este sistema tiene un valor de 57 al pH=3.5 al que se realiza la extracción. El flujo de la fase acuosa R es de 450 L/h y el de la fase orgánica E es de 37 L/h.

Se pide: Calcular el número de etapas necesarias para lograr el 99 % de recuperación del antibiótico.

Solución:

Solución gráfica. Para calcular gráficamente el número de etapas es necesario obtener una expresión para la curva de operación mediante la ecuación (6.46), para lo cual es necesario calcular primero la concentración de soluto a la salida en el refinado. Dado que se desea recuperar el 99 % del soluto esta concentración es:

$$y_1 = 0.01 \times 260 \ \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 2.6 \ \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

la expresión para la curva de operación es:

$$x_n = \frac{450}{37}(y_{n+1} - y_1) = 12.2 \ y_{n+1} - 31.62 \qquad [\text{mg/L}]$$

la relación de equilibrio para este caso está dada por:

$$x_n = 57y_n$$

Para realizar el cálculo gráfico se traza la curva de equilibrio utilizando el punto (0, 0) y la pendiente de 57. Seguidamente, se traza la línea de operación a partir del punto (2.6, 0) con pendiente 12.2. Una vez obtenidas las curvas se puede estimar el número de etapas mediante el proceso de trazado de escalones sobre la curva. En este caso es necesario utilizar dos escalas debido al rango tan amplio de variación de las concentraciones. Las curvas resultantes se muestran en la Figura 6.17. Se puede estimar que el proceso de extracción se completa en tres etapas.

Solución analítica. Dado que la relación de equilibrio es lineal, el cálculo también puede realizarse mediante el método analítico por medio de la ecuación (6.43), de tal manera que:

$$y_{n+1} = \left(\frac{F^{n+1} \ - \ 1}{F \ - \ 1}\right) 0.01 \ y_{n+1}$$

y en este caso el factor de extracción es:

$$F = \frac{(57)(37 \ \frac{\text{L}}{\text{h}})}{450 \ \frac{\text{L}}{\text{h}}} = 4.69$$

de tal manera que:

$$\frac{y_{n+1}}{0.01 \ y_{n+1}} = 100 = \frac{(4.69)^{n+1} - 1}{4.69 - 1}$$

rearreglando y tomando logaritmos se tiene:

$$\ln(370) = (n+1)\ln(4.69)$$

por lo tanto

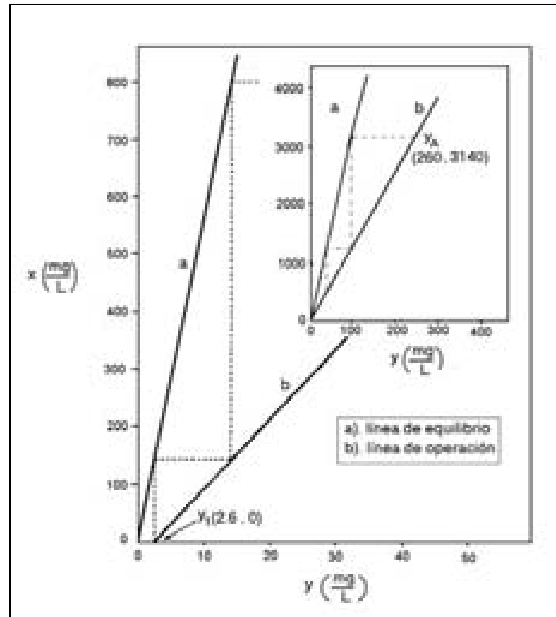


Figura 6.17: Etapas requeridas en la extracción de actinomicina del Ejemplo 6.8.

$$n = 2.8$$

se requieren tres etapas para esta extracción lo que coincide con el resultado obtenido por el método gráfico.

Ejemplo 6.9. Concentraciones en una operación a contracorriente.

En una operación de extracción a contracorriente en cada etapa se alcanza el equilibrio, el cual está dado por una relación lineal.

Se pide:

a) Establecer un algoritmo para el cálculo de las concentraciones de equilibrio en cada una de las n etapas de un sistema.

b) Calcular las concentraciones de equilibrio utilizando los siguientes datos: $x_0 = 0$, $y_{n+1} = 10$ g/L; $K = 20$; $R = 10.0$ L/min; $E = 1.0$ L/min y $n = 3$

c) Calcular la fracción extraída o rendimiento de la operación.

Solución:

a) La relación de equilibrio está dada por:

$$x_n = Ky_n$$

El balance de soluto en la etapa n puede expresarse como:

$$Ry_{n+1} \; + \; Ex_{n-1} = Ry_n \; + \; Ex_n$$

o bien como:

$$Fx_{n-1} - (1+F)x_n \; + \; x_{n+1} = 0$$

donde: $F = KE/R$.

El conjunto de balances para cada una de las etapas pueden expresarse matricialmente como:

$$A \cdot X = B$$

donde:

$$A = \begin{bmatrix} -(1+F) & 1 & 0 & 0 & \cdots & \cdots & 0 \\ F & -(1+F) & 1 & 0 & & & \vdots \\ 0 & F & -(1+F) & 1 & \ddots & & \vdots \\ \vdots & \ddots & \ddots & \ddots & \ddots & \ddots & \vdots \\ \vdots & & \ddots & F & -(1+F) & 1 & 0 \\ \vdots & & & \ddots & F & -(1+F) & 1 \\ 0 & \cdots & \cdots & \cdots & 0 & F & -(1+F) \end{bmatrix}$$

$$X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ \\ \vdots \\ x_n \end{bmatrix}; \qquad B = \begin{bmatrix} -Fx_0 \\ 0 \\ 0 \\ \\ \vdots \\ -Ky_{n+1} \end{bmatrix}$$

Este sistema puede ser resuelto de varias formas. En la Figura 6.18a se presenta un programa MATLAB para resolver el sistema.

b) Las concentraciones son:

n	x_n	y_n
1	13.3	0.67
2	40.0	2.00
3	93.3	4.67

La concentración en el extracto se va incrementando de etapa a etapa, mientras que la del refinado va disminuyendo.

c) La recuperación es:

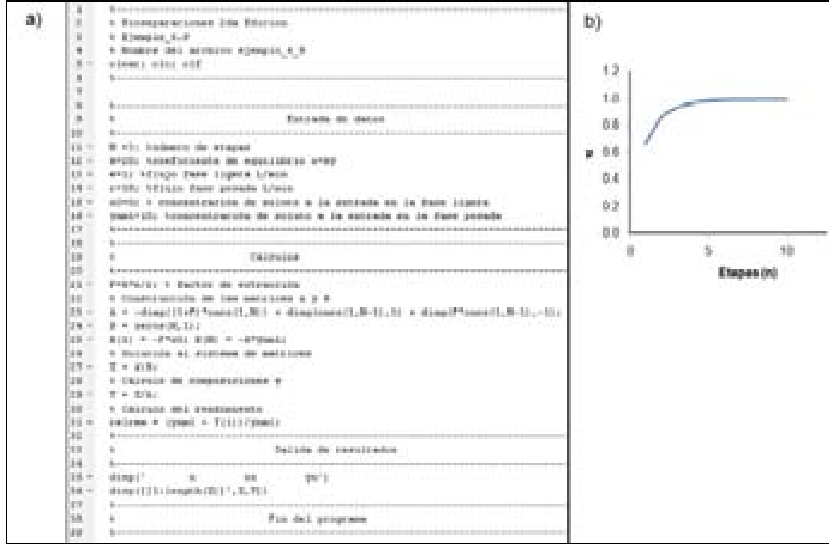


Figura 6.18: Solución Ejemplo 6.9. a) Programa MATLAB y b) Curva de rendimiento.

$$p = 0.93$$

En la Figura 6.18b se muestra como varía el rendimiento con el número de etapas para este sistema. Los rendimientos marginales son muy pequeños después de la etapa 3, para las condiciones estudiadas. El comportamiento dependerá de todos los parámetros de un sistema particular.

Escalamiento de columnas de platos Un método práctico que ha sido utilizado para escalar extractores utiliza el concepto de altura equivalente de una etapa teórica ($HETS$) definido como:

$$HETS = \frac{L}{n} \tag{6.47}$$

donde n es el número de etapas en el equilibrio y L es la altura del extractor.

El escalamiento se realiza mediante el uso de dos ecuaciones empíricas y dos condiciones de operación.

Las dos ecuaciones empíricas son (Karr, 1980):

$$\frac{(HETS)_2}{(HETS)_1} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{0.38} \tag{6.48}$$

$$\frac{(VR)_2}{(VR)_1} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{0.14} \tag{6.49}$$

donde D es el diámetro de la columna y VR es la velocidad reciprocante. Los índices 1 y 2 se refieren a las diferentes escalas.

Una condición de operación es mantener constante la razón del flujo de las fases entre las escalas:

$$\frac{E_2}{R_2} = \frac{E_1}{R_1} \tag{6.50}$$

y la segunda condición de operación es mantener constante el flux entre las escalas, obteniéndose la expresión:

$$\frac{Q_2}{D_2^2} = \frac{Q_1}{D_1^2} \tag{6.51}$$

donde $Q = E + R$.

Ejemplo. 6.10 Escalamiento de una columna de platos tipo Karr.

La operación de una columna de platos reciprocantes tipo Karr a nivel piloto, para la extracción de un antibiótico a partir de un caldo de fermentación utilizando acetato de amilo, se efectuó bajo las condiciones siguientes:

Datos planta piloto: Escala 1	
Coeficiente partición	$K = 7.5$
Flujo fase ligera	$E_1 = 105$ mL/min
Flujo del caldo	$R_1 = 70$ mL/min
Conc./conc.	$y_1/y_{n+1} = 0.07$
Longitud columna (operación)	$L_1 = 1.83$ cm
Díametro de la columna	$D_1 = 2.54$ cm
Velocidad reciprocante	$VR_1 = 280$ ciclos/min

Se desea escalar esta columna a nivel industrial para manejar $150,000$ L de caldo de fermentación en 12 h y lograr una extración donde la concentraciones en el refinado sea $y_1/y_{n+1} = 0.03$.

Se pide calcular:

a) Las dimensiones de la columna industrial: D_2 y L_2.

b) La velocidad reciprocante de la columna industrial: VR_2

Solución: a)

Paso 1. Se calcula las $HETS_1$, para lo cual es necesario calcular F_1 y n_1.

$$F_1 = \frac{KE_1}{R_1} = \frac{7.5 \times 105\ \dfrac{\text{mL}}{\text{min}}}{70\ \dfrac{\text{mL}}{\text{min}}} = 11.25$$

Sabemos que:

$$y_{n+1} = \left(\frac{F^{n+1}\ -\ 1}{F -\ 1}\right)(y_1)$$

entonces se puede despejar n,

$$n = \frac{\ln\left\{\frac{y_{n+1}}{y_1}\left[(F-\ 1)\right]+1\right\}}{\ln(F)} - 1$$

$$n_1 = \frac{\ln\left\{\left[\frac{1}{0.07}(11.25-\ 1)\right]+1\right\}}{\ln(11.25)} - 1 = 1.06$$

A nivel piloto la altura equivalente de una etapa teórica es:

$$(HETS)_1 = \frac{L_1}{n_1} = \frac{1.83\ \text{m}}{1.06} = 1.73\ \text{m}$$

Paso 2: Se calcula D_2, para lo cual primero se calcula E/R y Q_2.
La relación de fases es,

$$\frac{E_2}{R_2} = \frac{E_1}{R_1} = \frac{105\ \frac{\text{mL}}{\text{min}}}{70\ \frac{\text{mL}}{\text{min}}} = 1.5$$

de tal manera que:

$$Q_2 = E_2 + R_2 = 1.5R_2 + R_2 = 2.5R_2 = 2.5 \times \frac{150,000\ \text{L}}{12\ \text{h} \times \frac{60\ \text{min}}{\text{h}}} = 520.8\ \frac{\text{L}}{\text{min}}$$

Se puede calcular el D_2, mediante la ecuación del flux,

$$\frac{Q_2}{D_2^2} = \frac{Q_1}{D_1^2}$$

$$D_2 = \sqrt{\frac{Q_2 D_1^2}{Q_1}} = \sqrt{\frac{520.8\ \frac{\text{L}}{\text{min}} \times (2.54\ \text{cm})^2}{175\ \frac{\text{mL}}{\text{min}} \times \frac{\text{L}}{10^3\ \text{mL}}}} = 138.6\ \text{cm}$$

Paso 3. Se calcula L_2, para lo cual es necesario calcular n_2 y $HTPS_2$.

$$n_2 = \frac{\ln\left\{\frac{1}{0.03}\left[(11.25-\ 1)\right]+1\right\}}{\ln(11.25)} - 1 = 1.41$$

$$(HETS)_2 = (HETS)_1\left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{0.38} = 1.73\ \text{m} \times \left(\frac{138.6\ \text{cm}}{2.54\ \text{cm}}\right)^{0.38} = 7.91\ \text{m}$$

$$L_2 = n_2\ (HETS)_2 = 1.41 \times 7.91\ \text{m} = 11.15\ \text{m}$$

Solución b)

La velocidad reciprocante de la columna industrial es:

$$(VR)_2 = (VR)_1 \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{0.14} = 280\ \frac{\text{ciclos}}{\text{min}} \times \left(\frac{2.54\ \text{cm}}{138.6\ \text{cm}}\right)^{0.14} = 160\ \frac{\text{ciclos}}{\text{min}}$$

6.4.3. Extracción Diferencial

Cuando el contacto de la fase pesada y la fase ligera se efectúa en forma continua, se dice que la extracción se realiza en forma diferencial. El soluto se transfiere de una fase a otra a través de un contacto íntimo entre éstas, pero no se llega a alcanzar el equilibrio. Sin embargo, el resultado de este proceso es una extracción significativa del soluto deseado.

El análisis de la extracción diferencial depende de tres relaciones básicas:

a) La primera de ellas es una relación de equilibrio similar a las utilizadas en extracción por etapas y está dada por:

$$x = Ky^* \tag{6.52}$$

donde y^* es la concentración hipotética de soluto en la fase pesada en equilibrio con la concentración de soluto x en la fase ligera, en una altura dada de la columna.

b) La segunda relación es un balance de masa tomado en la base de la columna (Fig. 6.19). En esta figura se puede observar que la concentración de soluto a la entrada en la fase pesada R es y_L, y a la salida es y_o. La concentración de soluto a la entrada en la fase ligera E es $x_o = 0$ y a la salida es x_L.

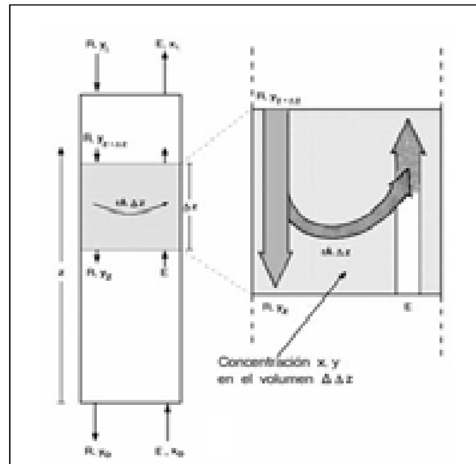


Figura 6.19: Esquema idealizado de una columna de extracción diferencial.

El balance de masa que resulta para este proceso a cualquier altura de la columna es:

$$Ry \ + \ Ex_o = Ry_o \ + \ Ex \tag{6.53}$$

que puede ser escrito cuando $x_o = 0$ como:

$$x = \frac{R}{E}(y \ - \ y_o) \tag{6.54}$$

donde x y y son las concentraciones de soluto en la posición z, las cuales no están en equilibrio. La línea de operación del proceso está dada por la expresión (6.54).

c) La tercera relación se deriva de un balance de masa interfacial de soluto, que describe la velocidad con que éste se transfiere de la fase pesada a la fase ligera. Este balance se realiza en un diferencial de volumen $\Delta V = A\Delta z$. En la Figura 6.19 se muestra el esquema para el balance de masa en este diferencial de volumen y que se expresa en palabras como:

$$\begin{aligned} \text{Acumulación de soluto en fase R} = {} & \text{Entrada de soluto} \\ & -\text{Salida de soluto} \\ & +\text{Producción} - \text{Transferencia} \end{aligned}$$

Este balance puede ser simplificado considerando que la acumulación es nula. Debido a que no hay producción de soluto el término correspondiente también es nulo. La velocidad de transferencia de soluto de la fase R a la fase E está dada por $rA\Delta z$, donde r es la velocidad de transferencia de masa volumétrica del soluto.

El balance de masa en el diferencial de volumen se puede escribir entonces como:

$$0 = R(y_{z+\Delta z} \ - \ y_z) \ - \ rA\Delta z \tag{6.55}$$

si se divide la ecuación anterior entre $A\Delta z$ y se toma el límite cuando $\Delta z \to 0$, la ecuación (6.55) se puede escribir como:

$$0 = \left(\frac{R}{A}\right)\frac{dy}{dz} \ - \ r \tag{6.56}$$

En la extracción diferencial una fase se dispersa en la otra en forma de gotas pequeñas, y el área de contacto es un factor muy importante para lograr una extracción rápida y eficiente. La velocidad de transferencia r es proporcional al área superficial de las gotas por unidad de volumen. La velocidad de transferencia r también es proporcional a que tan lejos está la concentración y del equilibrio. De acuerdo a lo anterior r se puede escribir como:

$$r = ka(y \ - \ y^*) \tag{6.57}$$

donde a es el área superficial de contacto por unidad de volumen, $y*$ es la concentración hipotética de soluto en la fase pesada en equilibrio con la concentración

de soluto en la fase ligera x. La constante k es el coeficiente de transferencia de masa. Este depende de las propiedades físicas de los fluidos en contacto tales como viscosidad, densidad y flujo. La constante k tiene dimensiones de velocidad.

La tercera relación requerida para el análisis de la extracción diferencial se obtiene combinando las ecuaciones (6.56) y (6.57),

$$\frac{dy}{dz} = \left(\frac{kaA}{R}\right)(y \; - \; y^*) \tag{6.58}$$

Las tres relaciones descritas se relacionan entre sí para obtener una ecuación de diseño.

La ecuación (6.58) está en función del diferencial dz. Esto permite calcular la longitud del extractor diferencial utilizando para ello las ecuaciones (6.52) y (6.54).

De acuerdo a la ecuación (6.58) la longitud del extractor diferencial puede ser obtenida mediante la siguiente expresión:

$$L = \int_0^L dz = \frac{R}{kaA} \int_{y_o}^{y_L} \frac{dy}{(y \; - \; y^*)}$$

combinando con la ecuación (6.52) se obtiene,

$$L = \frac{R}{kaA} \int_{y_o}^{y_L} \frac{dy}{\left(y \; - \; \frac{x}{K}\right)}$$

y con ecuación (6.54),

$$L = \frac{R}{kaA} \int_{y_o}^{y_L} \frac{dy}{\left\{y \; - \; \left[\frac{R}{EK}(y \; - \; y_o)\right]\right\}}$$

dado que $F = EK/R$, la ecuación anterior se puede escribir como:

$$L = \left(\frac{R}{kaA}\right)\left[\frac{F}{(F-1)}\right] \int_{y_o}^{y_L} \frac{dy}{\left(y \; + \; \frac{y_o}{F-1}\right)}$$

finalmente integrando se obtiene:

$$L = \left[\frac{R}{kaA}\right] \left\{ \left(\frac{F}{F-1}\right) \ln \left(\frac{y_L \; - \; \frac{x_L}{K}}{y_o} \right) \right\} \tag{6.59}$$

Al término de la ecuación (6.59) que aparece dentro de los paréntesis cuadrados se le llama en ingeniería "altura de una unidad de transferencia" HTU (de

sus siglas en inglés), tiene unidades de longitud y es una medida de la eficiencia del equipo. El término que aparece entre llaves es una cantidad adimensional llamada “número de unidades de transferencia” NTU (de sus siglas en inglés) que permite medir el grado de dificultad de la extracción. Valores grandes de NTU significan mayor dificultad en la extracción que valores pequeños.

La expresión (6.59) se puede escribir como:

$$L = [HTU]\{NTU\} \tag{6.60}$$

La ecuación (6.60) es la base para el diseño de un proceso de extracción diferencial líquido-líquido.

Ejemplo 6.11. **Separación de una mezcla racémica de leucina.**

Los módulos de fibras huecas constituyen una alternativa atractiva respecto al uso de equipos de extracción convencional debido su alta relación área/volumen (Ding *et al.*, 1992). Se utiliza una unidad de fibras huecas operando a contracorriente para separar l-leucina de d-leucina bajo las siguientes condiciones:

Fase extractora ligera	N-n-dodecil-l-hidroxiprolina en octanol
Fase acuosa	Agua (conteniendo l-leucina y
	d-leucina)
Longitud de las fibras	64 cm
Diámetro de las fibras	240 μm
Número de fibras	96
Flujo de la fase acuosa R	19.2 cm^3/h
Flujo de la fase orgánica E	76.8 cm^3/h
Coeficiente de partición K	0.331

Los microporos de las fibras se rellenaron con gel de polivinil-alcohol de tal manera que los solutos difunden a través de los poros sin que las fases se mezclen.

Se pide: Estimar el coeficiente de transferencia de masa volumétrico ka del sistema, si bajo las condiciones enunciadas la recuperación de d-leucina en la fase ligera fue del 99.97 %.

Solución:

Se requiere utilizar la ecuación (6.59) para estimar el parámetro ka y expresarla en términos de la recuperación p que en este caso está dada por la expresión:

$$p = \frac{Ex_L}{Ry_L}$$

otra expresión necesaria es la del balance global del soluto que es:

$$Ex_L = R(y_L - y_o)$$

combinando las dos ecuaciones anteriores,

$$\begin{aligned} p &= \frac{Ex_L}{Ry_L} = 1 - \frac{y_o}{y_L} \\ y_o &= y_L(1-p) \end{aligned}$$

con base a lo anterior la ecuación (6.59) puede expresarse como:

$$L = \left[\frac{R}{kaA}\right] \left\{ \left(\frac{F}{F-1}\right) \ln \left[\frac{y_L \;-\; \left(\dfrac{pRy_L}{KE}\right)}{y_L(1-p)}\right] \right\}$$

o bien como:

$$L = \left[\frac{R}{kaA}\right] \left\{ \left(\frac{F}{F-1}\right) \ln \left[\frac{1 \;-\; \dfrac{p}{F}}{(1-p)}\right] \right\}$$

La expresión anterior permite calcular k_a, para lo cual es necesario obtener primero el área de flujo A, que es la suma del área transversal de las 96 fibras.

$$A = \frac{(96)\left[\pi \times \left(240 \times 10^{-6}\text{ m}\right)^2\right]}{4} = 4.34 \times 10^{-2}\text{ cm}^2$$

también es necesario calcular el factor de extracción F,

$$F = \frac{KE}{R} = \frac{0.331 \times 76.8\ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{h}}}{19.2\ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{h}}} = 1.324$$

el coeficiente de transferencia de masa está dado por:

$$\begin{aligned} ka &= \left[\frac{19.2\ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{h}} \times \dfrac{\text{h}}{3600\text{ s}}}{(64\text{ cm})(4.43 \times 10^{-2}\text{ cm}^2)}\right] \left\{ \left(\frac{1.324}{1.324-1}\right) \ln \left(\frac{1 - \dfrac{0.9997}{1.324}}{1 - 0.9997}\right) \right\} \\ ka &= 5.15 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

Un método simplificado para el diseño de columnas considera a la columna formada por un conjunto de platos teóricos o etapas ideales. El número de platos teóricos N de una columna de contacto diferencial se calcula mediante los métodos empleados para la extracción continua de etapas múltiples. Este tratamiento da origen al concepto de altura equivalente a un plato teórico $HETP$ (de sus siglas en inglés), de tal manera que:

$$L = (HETP)(N) \tag{6.61}$$

Ejemplo 6.12. Extracción diferencial de penicilina.

La extracción de penicilina presente en fase acuosa utilizando una fase orgánica debe realizarse a pH ácido. Es recomendable que esta extracción se realice en un tiempo corto debido a que la penicilina es inestable a pH ácido. Esto puede lograrse en un extractor diferencial centrífugo tipo Podbielniak. Este extractor funciona como una columna de platos perforados enrollada sobre un eje giratorio que favorece el flujo a contracorriente de las fases.

Se cuenta con los siguientes datos de operación de un extractor tipo Podbielniak:

Coeficiente de partición	25 (fracción libre soluto)
Conc. de penicilina a la entrada	3.3×10^{-4} $\frac{\text{mol de penicilina}}{\text{mol de agua}}$
Conc. penicilina en el solvente	0
Flujo de alimentación	70 mol de agua/min
Flujo de extracto	3.5 mol de solvente/min
Pérdidas de penicilina	10 %

Se pide calcular:

a) La fracción mol de penicilina en el extracto de salida.

b) El número de etapas teóricas de la operación.

Solución:

a) La fracción de soluto en el extracto de salida puede ser obtenida mediante la ecuación (6.54),

$$\begin{aligned}
x_L &= \left(\frac{R}{E}\right)(y_L - y_o) \\
x_L &= \left(\frac{70\ \frac{\text{mol}}{\text{min}}}{3.5\ \frac{\text{mol}}{\text{min}}}\right)\left[3.3 \times 10^{-4} - (0.1)(3.3 \times 10^{-4})\right]\frac{\text{mol}}{\text{mol}} \\
x_L &= 5.94 \times 10^{-3}\ \frac{\text{moles de penicilina}}{\text{moles de solvente}}
\end{aligned}$$

b) El número de etapas teóricas puede ser calculado mediante la ecuación (6.43) que en este caso se puede escribir como:

$$\frac{y_o}{y_L} = \frac{F - 1}{F^{n+1} - 1}$$

se requiere calcular el factor de extracción,

$$F = \frac{KE}{R} = \frac{25 \times 3.5\ \dfrac{\text{mol}}{\text{min}}}{70\ \dfrac{\text{mol}}{\text{min}}} = 1.25$$

entonces el cálculo del número de etapas mediante la ecuación (6.43) modificada es:

$$\begin{aligned} 0.1 &= \frac{1.25 - 1}{(1.25)^{n+1} - 1} \\ n &= 4.6 \end{aligned}$$

6.4.4. Extracción por Etapas no en Equilibrio

En la extracción por etapas no en equilibrio, el tiempo para realizar la extracción no es suficiente para alcanzar el equilibrio, entonces el análisis debe considerar la transferencia de masa interfacial. La descripción del sistema se realiza mediante la relación de equilibrio, la expresión de la velocidad de transferencia interfacial, un balance de soluto en el extracto y otro en el refinado:

$$x_n = K y_n \tag{6.62}$$

$$r = ka(y_n - y_n^*) \tag{6.63}$$

$$E x_{n-1} + rR = E x_n \tag{6.64}$$

$$R y_{n+1} = R y_n + Rr \tag{6.65}$$

donde: r es la velocidad de transferencia interfacial del soluto, k es el coeficiente de transferencia de masa, a es el área superficial de contacto por unidad de volumen, y^* es la concentración hipotética de soluto en la fase pesada en equilibrio con la concentración de soluto x en la fase ligera.

Combinando la relación de equilibrio y la de transferencia de masa, con cada uno de los balances se tiene para el extracto y el refinado las siguientes expresiones:

$$E x_{n-1} - \left(\frac{Rka}{K} + E \right) x_n + Rka y_n = 0 \tag{6.66}$$

$$(1 + ka)\,y_n - y_{n+1} - \left(\frac{ka}{K}\right) x_n = 0 \tag{6.67}$$

Ejemplo 6.13. Concentraciones en una operación a contracorriente sin equilibrio.

En una operación de extracción a contracorriente el tipo de equilibrio es lineal pero el tiempo de contacto es insuficiente para alcanzar éste.

Se pide:

a) Establecer un algoritmo para el cálculo de las concentraciones en cada una de las n etapas de un sistema.

b) Calcular el rendimiento global y las concentraciones en cada etapa utilizando los siguientes datos: $x_0 = 0$, $y_{n+1} = 10$ g/L; $K = 20$; $R = 10.0$ L/min; $E = 1.0$ L/min, $ka = 5$ min^{-1} y $n = 3$

Solución:

a) El conjunto de balances de soluto en el extracto para cada una de las etapas pueden expresarse matricialmente como:

$$C \cdot X + (Rka)\,Y = D \tag{a}$$

El conjunto de balances de soluto en el refinado para cada una de las etapas pueden expresarse matricialmente como:

$$A \cdot Y - \left(\frac{ka}{K}\right) X = B \tag{b}$$

donde :

$$A = \begin{bmatrix} (1+ka) & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & (1+ka) & -1 & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & (1+ka) & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & (1+ka) \end{bmatrix}$$

$$C = \begin{bmatrix} -\left(\frac{Rka}{K} + E\right) & 0 & \cdots & \cdots & 0 \\ E & -\left(\frac{Rka}{K} + E\right) & 0 & \cdots & \vdots \\ 0 & \ddots & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & & E & -\left(\frac{Rka}{K} + E\right) & 0 \\ 0 & 0 & \cdots & E & -\left(\frac{Rka}{K} + E\right) \end{bmatrix}$$

$$B = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ \vdots \\ y_{n+1} \end{bmatrix}; \quad D = \begin{bmatrix} -EX_0 \\ 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix}; \quad X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ \vdots \\ x_n \end{bmatrix}; \quad Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}$$

Puede ser demostrado que para este sistema se cumple que (Elnashaie y Uhlig, 2007):

$$\left\{ \left[\frac{ka}{K} \right]^{-1} [C]\,[A] + [Rka] \right\} Y = \left[\frac{ka}{K} \right]^{-1} CB + D \tag{c}$$

$$CX = D - RkaY \tag{d}$$

Para el cálculo de las composiciones, primero se obtiene Y de la ecuación (c) y posteriormente con la ecuación (d) se obtiene X. En la Figura 6.20 se presenta un programa MATLAB para el cálculo.

Figura 6.20: Programa MATLAB para el cálculo de las concentraciones en cada etapa en una operación a contracorriente sin equilibrio.

b) El rendimiento alcanzado es:

$$p = 0.89$$

Las concentraciones en g/L son:

n	x_n	y_n
1	15.74	1.10
2	42.72	2.68
3	88.98	5.37

6.4.5. Extracción Fraccionaria

La extracción fraccionaria es una técnica de separación en la cual una fase ligera E que contiene varios solutos, se pone en contacto con una serie de tubos que contienen originalmente, fase pesada R pura. El resultado de este proceso es la separación de los distintos solutos contenidos en el solvente E.

Este proceso de extracción también es conocido como extracción Craig (debido a que fue desarrollado inicialmente por L.C. Craig como extracción a contracorriente) o como extracción fraccionaria con una fase estacionaria.

La extracción fraccionaria se fundamenta en la diferencia del coeficiente de partición de los solutos. Cuando se tiene un solvente conteniendo varios solutos que poseen diferentes coeficientes de partición, éstos pueden separarse entre sí por medio de la extracción fraccionaria.

La extracción fraccionaria consiste de repartos repetidos de una mezcla de solutos entre dos disolventes inmiscibles. El fundamento se muestra en la Figura 6.21a donde un soluto A es extraído por este proceso. El coeficiente de partición entre los disolventes E y R está dado por:

$$K_p(A) = \frac{x_A}{y_A} = 1$$

La extracción se realiza de la siguiente forma:

a) Inicialmente el soluto A (64 unidades) se encuentra disuelto en un volumen de fase ligera E y se localiza en el tubo 1 junto con un volumen de fase pesada R.

b) Inicialmente los tubos del 2 al 7 contienen volúmenes iguales de disolvente puro R.

c) El tubo 1 se agita hasta alcanzar el equilibrio; el resultado es una distribución del soluto A entre las fases E y R en cantidades iguales, es decir 32 unidades en cada una.

d) El solvente E de la capa superior del tubo 1, se transfiere al tubo 2.

e) Se añade al tubo 1 un volumen de solvente fresco E.

f) Se agitan los tubos 1 y 2 hasta alcanzar el equilibrio, donde cada fase en ambos tubos contiene 16 unidades de soluto A, puesto que el coeficiente de distribución $K_p(A) = 1.0$.

g) Se separa la fase ligera de los tubos y se añade al siguiente de la derecha.

h) Se añade al tubo 1 un volumen de solvente fresco E.

i) Se repite el proceso las veces que sea necesario.

El esquema de la Figura 6.21a muestra los resultados de siete transferencias. Comúnmente, en la práctica real de laboratorio, se emplean 100 o más etapas de

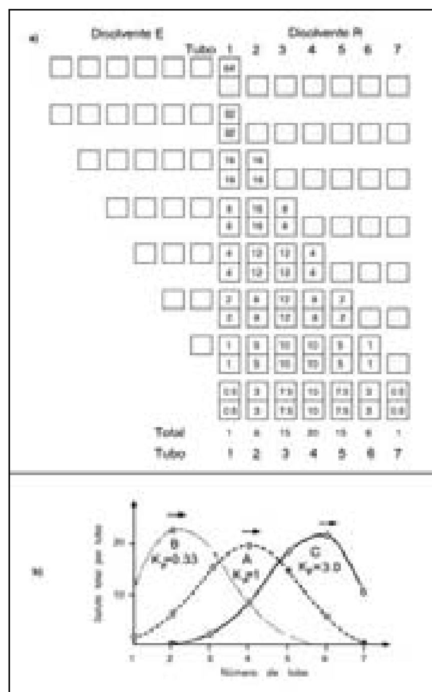


Figura 6.21: Extracción de Craig: a) Esquema del principio de extracción fraccionaria con una fase móvil y b) Gráfica para cada tubo y varios solutos.

distribución para separar mezclas de aminoácidos o de proteínas. La cantidad total de soluto A, en cada uno de los siete tubos, se presenta en la gráfica de la Figura 6.21b.

Con el fin de comparar la forma en que se distribuyen varios solutos con diferente coeficiente de partición, también se muestra en la Figura 6.21b la distribución de los solutos B y C en concentraciones arbitrarias de 64 unidades cada uno. El soluto B, posee un coeficiente de partición,

$$K_p(B) = \frac{x_B}{y_B} = 0.33$$

y el soluto C,

$$K_p(C) = \frac{x_C}{y_C} = 3.0$$

La figura indica que a mayor coeficiente de partición K_p, mayor es la cantidad de soluto desplazada en cada transferencia. Debido a que cada soluto se mueve independientemente del otro de acuerdo a su coeficiente de partición, la mezcla de solutos A, B y C se separará por completo en tres picos después de un número determinado de transferencias.

La extracción fraccionaria con una fase móvil es de aplicación general y puede emplearse como técnica de bioseparación para diferentes tipos de solutos como: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos. Este principio también sirve de base para las operaciones cromatográficas que se revisan posteriormente.

Perfil de concentración

A diferencia de los procesos de extracción vistos en las secciones anteriores, en la extracción fraccionaria el soluto desarrolla un perfil de concentraciones distribuido a través de todos los tubos, lo cual no se presenta en otro tipo de procesos de extracción. Otra forma de representar la extracción fraccionaria es mediante el esquema que se muestra en la Figura 6.22.

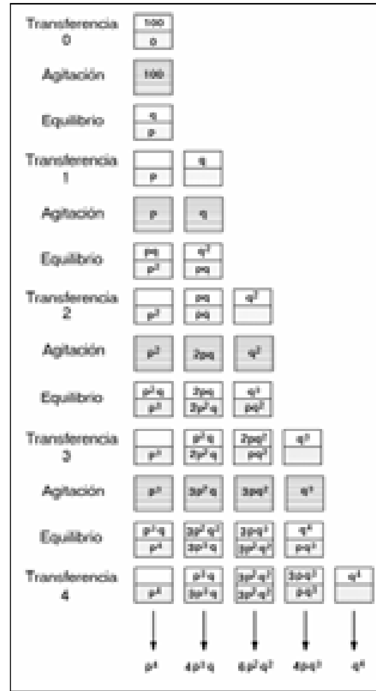


Figura 6.22: Representación esquemática de la distribución de la concentración de un soluto en la extración fraccionaria con una fase móvil.

En la Figura 6.22 se muestra la distribución de soluto en cada tubo después que se realiza la transferencia y se alcanza el equilibrio, cuando la recuperación en cada etapa es p. Se muestra que al final de la cuarta transferencia, la distribución de la concentración en los tubos sigue una forma binomial.

En la extracción fraccionaria la fracción f de soluto original que se encuentra en el tubo r (en ambas fases), después de las n transferencias está dada por:

$$f(r,n) = \frac{n!}{r!(n-r)!} p^{n-r}(1-p)^r \tag{6.68}$$

donde:

$$p = \frac{F}{1+F}$$

$$F = \frac{EK}{R}$$

$$r = 0, 1, 2, 3.... \ n$$

Cuando el número de transferencias n es muy grande la ecuación (6.68) se aproxima a una distribución gausiana y se tiene que:

$$f(r,n) = \frac{1}{[2\pi np(1-p)]^{1/2}} \exp\left(-\frac{(r-np)^2}{2np(1-p)}\right) \tag{6.69}$$

Este perfil tiene un máximo cuando $r = np$.

Ejemplo 6.14. Aislamiento de ácido quenodeoxicolico.
El ácido biliar quenodeoxicolico es aislado mediante una extracción de Craig usando 400 transferencias. La fase pesada es agua y la fase ligera es n-butanol; la proporción de las fases se ajusta de tal manera que el factor de extracción F sea igual a uno.

Se pide: Una vez que se realizan las 400 transferencias, determinar:

a) El número de tubo de máxima concentración.

b) La concentración de soluto en dicho tubo.

Solución:

a) De acuerdo a la ecuación (6.69) la fracción de soluto f tiene un máximo cuando $r = np$, ya que en este punto el valor de la exponencial es máximo e igual a uno.

El tubo que tiene la concentración máxima de soluto es:

$$r = np = 400 \frac{1}{1+1} = 200$$

b) La fracción de soluto en el tubo 200 después de 400 transferencias está dada de acuerdo a la ecuación (6.69) por:

$$f(r,n) = f(200, 400) = \frac{1}{[(2\pi)\,(400)(0.5)(0.5)]^{1/2}} = 0.04$$

esto significa que solamente el 4 % de la concentración de soluto original está presente en el tubo de máxima concentración después de 400 transferencias.

6.5. Sumario

La extracción es una operación que se emplea para concentrar solutos de interés a partir de caldos biológicos diluidos. Se basa en la diferencia de solubilidad de los solutos entre dos fases: el caldo biológico y el solvente de extracción.

En la extracción se emplean diversos solventes que pueden ser seleccionados combinando criterios establecidos y la teoría que se dispone. En el caso de productos como las proteínas se utilizan sistemas de dos fases acuosas inmiscibles que permiten el manejo de estos productos en forma más apropiada.

Existe una gran variedad de equipos para realizar la operación de extracción y ésta puede realizarse en forma por lotes o continua. Los métodos de diseño de los extractores pueden ser gráficos o analíticos y están basados en relaciones de equilibrio y balances de masa.

6.6. Problemas

6.1. Selectividad de solvente. En la separación de Ajmalicina de $pK_a = 6.3$ y Serpentina de $pK_a = 10.8$, dos alcaloides vegetales de estructura muy semejante; se dispone de un solvente en el cual el coeficiente de partición intrínseco es igual para ambas especies.

Se pide:

a) Calcular el valor de K_p/K_i para ambas especies a los pH de 2, 4, 6, 8, 10 y 12.

b) Calcular la selectividad de Ajmalicina a los pH de 2, 4, 6, 8, 10 y 12.

c) ¿Qué sistema recomienda a para realizar la extracción?

Resp. b)

pH	2	4	6	8	10	12
β	31,621	31,465	21,065	620	7.3	1.1

6.2. Cálculo de pK$_a$. Una solución de ácido acético al 0.01 M presenta una disociación del 4 % a 25 ^{o}C.

Se pide calcular:

a) La constante de disociación.

b) El pK_a

Resp. b) 4.77

6.3. Grado de concentración. Un volumen V_o de solución con una concentración C_o del soluto de interés, se mezcla con un volumen V de una solución que contiene dos polímeros dando origen a dos fases acuosas inmiscibles $(E+R)$ entre las cuales se reparte el soluto. En el caso que el soluto se distribuya preferentemente en la fase superior E, expresar el grado de concentración (GC) y el rendimiento (p) en función de V_o, E, R y K_p.

6.4. Cálculo de relación de volúmenes. Se desea separar una mezcla que contiene igual cantidad de masa de dos enzimas, en un sistema de dos fases acuosas inmiscibles en el cual las enzimas C y D presentan coeficientes de partición de $K_{pC} = 0.5$ y $K_{pD} = 0.011$, respectivamente.

Se pide estimar:

a) La proporción E/R para que la masa de C en la fase ligera E, sea igual a la masa de D en la fase pesada R.

b) El rendimiento y la pureza de la extracción de la enzima C, si la relación E/R es la determinada en a).

Resp. b) 96.4 % y 87 %

6.5. Extracción continua de etapas en equilibrio. Una solución que contiene 20 g/L de estreptomicina se procesa en un sistema continuo de etapas múltiples, en el cual el factor de extracción empleado es igual a 3.

Se pide:

a) Calcular la concentración de estreptomicina en el refinado a la salida en los casos que el sistema conste de 1, 2, 3 y 10 etapas.

b) ¿Cuántas etapas se recomiendan para realizar esta extracción?

Resp. a) 1 etapa: 5 g/L.

6.6. Extracción diferencial. Demostrar que en una extracción diferencial con $y_L = 0$ y con extracción de soluto de la fase E a la fase R, la longitud de la columna está dada por:

$$L = \frac{E}{K_a A}\left(\frac{1}{F-1}\right)\ln\left(\frac{x_L}{x_o - K y_o}\right)$$

6.7. Extracción continua de un antibiótico por etapas en equilibrio. Se extrae estreptomicina de un caldo de cultivo utilizando un solvente orgánico, en un sistema de extracción a contracorriente de 5 etapas. El coeficiente de partición de la estreptomicina en el sistema a un pH de 4 es de 40. El flujo de la fase pesada R es de 150 L/min.

Se pide: Estimar el flujo de fase ligera E para reducir la concentración de estreptomicina en la solución de 10 a 0.2 g/L.

Resp. 7 L/min

6.8. Eliminación de metales pesados. En el desarrollo de un proceso (Wisniak *et al.*, 1990) para la eliminación de mercurio(II) de corrientes industriales de desecho, se emplea como fase extractiva aceite de jojoba sulfurado (acomplejante de Hg II) disuelto en queroseno.

El coeficiente de partición del Hg(II) en el sistema agua-aceite de jojoba (queroseno) varía directamente con la concentración de jojoba en el queroceno e inversamente con la concentración inicial de Hg(II) en la fase acuosa.

Los datos obtenidos en cinco etapas de extracción intermitente utilizando extractante fresco (20 g/L de aceite sulfurado de jojoba) en cada una de ellas, se muestran en la tabla siguiente:

	Fase acuosa ppm **de Hg(II)**		**Coeficiente de partición**
Etapa	Inicial	Final	K_p
1	1091.00	146.400	6.4
2	146.40	19.600	54.6
3	19.60	2.000	555.0
4	2.00	0.090	12,499.0
5	0.09	0.005	100,000.0

Se pide calcular:

a) La eficiencia de recuperación de cada etapa.

b) La eficiencia de recuperación global al final de cada etapa.

c) La relación de fase acuosa a fase orgánica empleada en cada etapa (R/E).

d) La cantidad de fase orgánica por litro de fase acuosa utilizada en cada etapa y la cantidad total para las cinco etapas.

e) La cantidad de fase orgánica necesaria para procesar un litro de solución acuosa en una etapa y obtener la misma eficiencia que la alcanzada en las cinco etapas.

f) Con base a los resultados anteriores que proceso se recomienda si el límite tolerable de Hg(II) es de 0.005 ppm.

Resp. para etapa 3: a) 89.8 % b) 99.82 % y c) 63

6.9. Extracción diferencial de una enzima. En una columna empacada con anillos rashing se utiliza un sistema de dos fases inmiscibles PEG 4000 - Na_2SO_4 para extraer amiloglucosidasa de la fase ligera dispersa (PEG 4000) hacia la fase continua (Na_2SO_4). La enzima presenta un coeficiente de partición en el sistema de 0.0345 (Patil *et al.*, 1991). La viscosidad de la fase dispersa es de 24×10^{-3} kg/m−s.

La resistencia a la transferencia de masa se localiza en la fase ligera dispersa y puede ser caracterizada mediante el coeficiente de transferencia de masa dado por:

$$k_a = 6 \times 10^{-7}\ \upsilon^{0.49}\ \mu^{-2.666}$$

donde:

υ: Velocidad superficial de la fase dispersa.[m/s].

μ: Viscosidad de la fase dispersa. [kg/m−s].

k_a: Coeficiente de transferencia de masa. [s^{-1}].

Se pide:

a) Determinar la longitud necesaria de una columna de 56 mm de diámetro interno, alimentada con un flujo de 985 mm^3/s de fase dispersa y 68 mm^3/s de fase pesada, para producir una disminución del 20 % de la concentración de enzima de la fase ligera.

b) Obtener una gráfica de la longitud necesaria de la columna en función de R para las condiciones de extracción anteriores.

c) ¿Que flujo R recomienda a para esta operación?

Resp. a) 1053 mm

6.10. Extracción fraccionaria. En un sistema de extracción fraccionaria tipo Craig los componentes B y C de una mezcla presentan coeficientes de partición de $K_{pB} = 0.33$ y $K_{pC} = 3.0$, respectivamente.

Se pide: Obtener el perfil de concentración de cada uno de los solutos a lo largo de los tubos, en los siguientes casos:

a) $E/R = 0.2$ y número de transferencias 30, 60 y 90.

b) $E/R = 1$ y número de transferencias de 30, 60 y 90.

c) $E/R = 5$ y número de transferencias de 30, 60 y 90.

d) ¿Cuál de los 9 sistemas recomienda?

6.11. Extracción diferencial. Las proteínas pueden ser extraídas sin ser desnaturalizadas con soluciones de iso-octano que contengan el detergente aerosol OT. Las proteínas se solubilizan dentro de las miscelas que forma el detergente. Debido a que la cantidad de proteína solubilizada depende fuertemente del pH, las proteínas pueden ser extraídas con el solvente orgánico a un pH dado cercano al punto isoeléctrico, y posteriormente desorberse a un pH diferente.

Se está estudiando una solución acuosa que contiene 0.2 % de proteína, cuya relación de equilibrio está dada por:

$$x = 2.9y^*$$

donde x es la concentración de proteína en la fase orgánica y $y*$ es la concentración de equilibrio en la fase acuosa. La relación volumétrica entre las fases es de 6.8 L de solución acuosa por cada 3.8 L de solución orgánica.

Se pide: Calcular la concentración del refinado a la salida y la fracción extraída cuando se utiliza una columna de extracción diferencial de 2.0 m. en la cual el HTU (basado en la concentración acuosa) es 0.85 m.

Resp. $y = 0.04\,\%$ y $p = 0.8$.

6.12. Cálculo del número de etapas. A partir del programa del Ejemplo 6.9, escribir un programa que calcule las etapas necesarias para alcanzar un determinado rendimiento en una cascada a contracorriente con equilibrio lineal.

6.13. Cálculo de ka. Una operación a contracorriente de etapas sin equilibrio se espera realizar bajo las siguientes condiciones: $x_0 = 0$, $y_{n+1} = 10$ g/L; $K = 20$; $R = 10.0$ L/min; $E = 1.0$ L/min y $n = 3$.

Se pide:

a) Calcular el valor del coeficiente de transferencia de masa, ka, para que la operación alcance el equilibrio.

b) Calcular las concentraciones de equilibrio.

6.14. Extracción en un SDFA en cascada. Se va extraer una proteína recombinante a partir de un caldo de fermentación utilizando un ligando de afinidad unido a PEG. La constante de partición de la proteína conjugada es de $K = 40$ y el volumen del caldo es de $1,000$ L. En el proceso se utilizan 5 etapas de extracción y el objetivo es reducir la concentración de proteína en el caldo de 10 g/L a 0.2 g/L.

Se pide calcular:

a) El volumen de necesario de la fase rica en PEG.

b) El número de etapas necesarias si se desea obtener un factor de concentración $x_n/y_{n+1} = 30$ y la misma recuperación.

Resp. a) 47.23 L y b) 10 etapas.

6.15. Extracción de Penicilina G. La extracción de penicilina G se realiza en dos pasos. En el primer paso se extrae la penicilina G del caldo de fermentación hacia la fase orgánica, utilizando un pH ácido bajo que favorece la purificación. En el segundo paso se transfiere la penicilina G a una fase acuosa utilizando un pH ligeramente ácido. Esto permite la cristalización posterior de la penicilina sin la presencia del solvente.

En un proceso continuo para la extracción de Penicilina G, para cada uno de los pasos se utiliza un extractor tipo Podbielniak. Cada equipo opera con dos etapas de extracción teóricas.

En el primer paso, la alimentación al extractor es de $3,000$ L/h y se utiliza una relación de caldo a solvente de 10. La extracción se opera a un pH=2.0 de tal manera que Kp_1=60.

En el segundo paso, se utiliza un volumen de agua de 900 L y se opera a pH=5.6 de tal manera que Kp_2=2.

Se pide calcular:

a) La recuperación de penicilina G en el primer paso.

b) La recuperación de penicilina G en el segundo paso.

c) La recuperación global de penicilina G.

Resp. a) 98 % y c) 95 %.

6.7. Bibliografía

Albertsson, P.; Johansson, G.; Tjerneld, F. **1990**. Aqueous two-phase separations. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York. 287-319.

Azevedo, A.M.; Rosa, P.A.J.; Ferreira, I.F.; Aires-Barros, M. **2007**. Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *J. Biotech.*132, 209–217.

Baskir, J. N.; Hatton, T. A.; Suter, U. W. **1989**. Protein partitioning in two - phase aqueous polymer systems. *Biotech. Bioeng.* 34, 541-558.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley and Sons. New York. 5, 99-143.

Benavides, J.; Rito-Palomares, M. **2008**. Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83,133–142.

Chethana, S.; Rastogi, N.K.; Raghavarao, K.S.M.S. **2007**. New aqueous two phase system comprising polyethylene glycol and xanthan. *Biotech. Letters.* 28: 25–28.

Clark, W.M. **1989**. Thermodynamics of protein partitioning in aqueous two phase systems. En: *Chemical Engineering Problems in Biotechnology.* Shuler, M.L. (Ed.). New York. 147-181.

Diamond, A.D.; Hsu, J.T. **1990**. Protein partitioning in PEG/Dextran aqueous two-phase systems. *AIChE J.* 36, 1017-1024.

Ding, H.B.; Carr, P.W.; Cussler E.L. **1992**. Racemic leucine separation by hollow-fiber extraction. *AIChE J.* 38, 1493-1498.

Elnashaie, S.; Uhlig, F. **2007**. *Numerical Techniques for Chemical and Biolo gical Engineers Using MATLAB®*. Springer Science and Business Media, LLC. New York, NY.

Huddleston, J.; Veide, A.; Kohler, K.; Flanagan, J.; Enfors, S.; Lyddiatt, A. **1991**. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. *TibTech.* 9, 381-388.

Jiang, J.; Prausnitz, J.M. **2000**. Molecular thermodynamics for partitioning of native and denatured proteins in aqueous two-phase systems. *J. Phys. Chem. B.* 104, 7197-7205.

Karr, A.E. **1980**. Design, scale-up, and applications of the reciprocating plate extraction column. *Sep. Sci. Tech.* 15, 877 - 905.

Mazzola, P.G.; Lopes, A.M.; Hasmann, F.A.; Jozala, A.F.; Penna, T.C.V.; Magalhaes, P.O.; Rangel-Yagui, C.O.; Pessoa A. **2008**. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *J. Chem. Technol. Biotech.* 83, 143-157.

Mattiasson, B.; Ling, T.G.I. **1987**. Extraction in aqueous two-phase systems for biotechnology. En: *Separations for Biotechnology.* Verral, M.S. y Hudson, M.J. (Eds.). Ellis Horwood Limited. New York. 270-292.

Mattiasson, B.; Rajni, K. **1991**. Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems. En: *Extractive Bioconversions.* Mattiasson, B.; Holst, O. (Eds.). Marcel Dekker Inc. New York. 173-188.

Naganagouda, K.; Mulimani, V.H. **2008**. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of Aspergillus oryzae a-galactosidase. *Process Biochem.* 43,1293–1299.

Patil, T.A.; Jafarabad, K.R.; Sawant, S.B.; Joshi J.B. **1991**. Enzime mass transfer coefficient in aqueos two phase system using packed extraction column. *Canad. J. Chem. Eng.* 69, 548-556.

Porto, T.S.; Silva, G.M.M.; Porto, C.S.; Cavalcanti, M.T.H.; Neto, B.B.; Lima-Filho, J.L.; Converti, A.; Porto, A.L.F.; Pessoa, A. **2008**. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chem. Eng. Processing.* 47, 716–721.

Shao, Z.; Kong, F.; Cao, X. **2009**. Phase diagram prediction of recycling aqueous two-phase systems formed by a light-sensitive copolymer and dextran. *Korean J. Chem. Eng.* 26, 147-152.

Shibukawa, M.; Ichikawa, R.; Baba, T.; Sakamoto , R.; Saito, S.; Oguma, K.B. **2008**. Separation selectivity of aqueous polyethylene glycol-based separation systems: DSC, LC and aqueous two-phase extraction studies. *Polymer.* 49, 4168–4173.

Stella, A.; Mensforth, K.H.; Bowser, T.; Stevens, G.W.; Pratt, H.R.C. **2008**. Mass transfer performance in Karr reciprocating plate extraction columns. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 3996–4007.

Wisniak, J.; Schorr, G.; Zcovsky, D.; Belter S. **1990**. Extraction of mercury(II) with sulfurized jojoba oil. *Ind. Eng. Chem. Res.* 29, 1907-1914.

Capítulo 7

Adsorción

7.1. Introducción

La adsorción es una de las operaciones más utilizadas en la etapa de concentración de caldos acuosos diluidos. Mediante la adsorción las moléculas de un soluto se concentran en una superficie sólida por la acción de fuerzas intermoleculares entre el soluto y el sólido. Debido a la naturaleza de estas fuerzas el fenómeno es fácilmente reversible. La adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie y debe distinguirse de la absorción la cual implica la penetración de una sustancia en el cuerpo de otra.

La concentración de uno o varios solutos de un caldo mediante una operación de adsorción requiere cuatro pasos (Fig. 7.1). Primero el adsorbente y la solución se ponen en contacto. Al efectuarse la adsorción el soluto se une preferentemente a la superficie del adsorbente respecto a otros solutos. Una vez concluida la adsorción es necesario lavar la columna con una solución que no provoque la desorción del soluto de interés. Al terminar el lavado se efectúa la recuperación del soluto utilizando un fluido que favorezca la desorción, operación conocida como elución. Finalmente, se trata la columna para restablecer su condición inicial mediante una regeneración. Esta operación puede incluir un tratamiento de limpieza con una solución alcalina.

Es importante resaltar que el análisis ingenieril de las etapas de adsorción, lavado y elución, es análogo. En este capítulo sólo se revisa lo referente a la etapa de adsorción por considerarse que los principios aquí expuestos pueden extenderse al análisis de las otras etapas.

En el análisis de la operación de adsorción, al igual que en otras operaciones de transferencia de masa, se utilizan modelos para el diseño, análisis de alternativas (columnas en serie vs. columnas en paralelo), optimización, o simplemente para la obtención de datos experimentales. La formulación de algunos de estos modelos requiere:

a) El establecimiento de las relaciones de equilibrio y de la capacidad de adsorción de los sistemas.

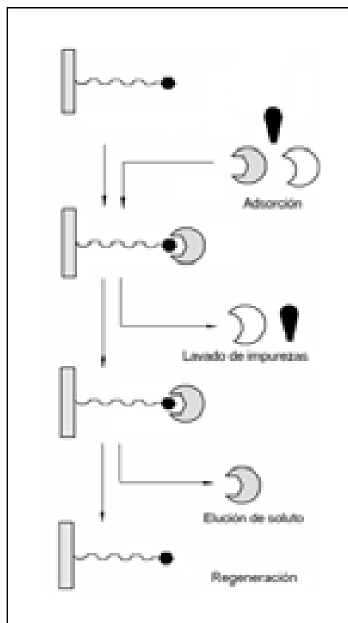


Figura 7.1: Las etapas de la adsorción como proceso unitario. Adsorción, Lavado, Elución y Regeneración. Fuente: Clonis,1990. Reproducida con el permiso de Marcel Dekker Inc. Copyright ©1990. Todos los derechos reservados.

b) El establecimiento de la rapidez de la adsorción con respecto a los fenómenos difusivos y cinéticos de superficie.

c) Los balances de masa y energía del sistema de adsorción específico (por lotes, continuo, serie, paralelo, etc.).

d) Las condiciones iniciales y de frontera del sistema.

En la sección 7.2 de este capítulo se presentan los fundamentos de la operación de adsorción como la química de la adsorción, los tipos de adsorbentes, las curvas de equilibrio de los sistemas llamadas isotermas de adsorción y los aspectos básicos de la cinética de la adsorción. En la sección 7.3 se describen los principales equipos utilizados en las operaciones de adsorción y en la sección 7.4 se presentan los balances y principios para el diseño de tales equipos.

7.2. Fundamentos

Las operaciones de adsorción son utilizadas en la obtención de varios tipos de productos biotecnológicos como aminoácidos, antibióticos, vitaminas, proteínas y DNA. También son muy empleadas con otros propósitos como la remoción de partículas virales en procesos de obtención de farmacéuticos como anticuerpos monoclonales (Strauss *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, cada vez existe una

mayor necesidad de profundizar en los aspectos fundamentales de la operación (principalmente en el contexto del procesamiento de caldos biológicos), de los cuales se pueden destacar cuatro:

- Tipos de adsorción según la interacción soluto-adsorbente.
- Principales tipos de adsorbentes.
- Relaciones de equilibrio.
- Cinética de la adsorción.

7.2.1. Tipos de Adsorción: Interacción Soluto-Adsorbente

De acuerdo al tipo de interacción del soluto con el adsorbente, se pueden distinguir cuatro tipos de adsorción básicos (Fig. 7.2): a) física, b) iónica, c) hidrofóbica y d) afinidad.

En la adsorción física las fuerzas de atracción entre el soluto y el adsorbente son de tipo London-van Der Waals. En la adsorción iónica la diferencia de cargas entre el adsorbente y el soluto genera atracciones electrostáticas más fuertes y selectivas. La adsorción hidrofóbica se produce por interacciones entre regiones hidrofóbicas del soluto y el adsorbente. La adsorción por afinidad está basada en interacciones altamente específicas entre el adsorbente y el soluto, lo que caracteriza a este tipo de adsorción como altamente selectiva.

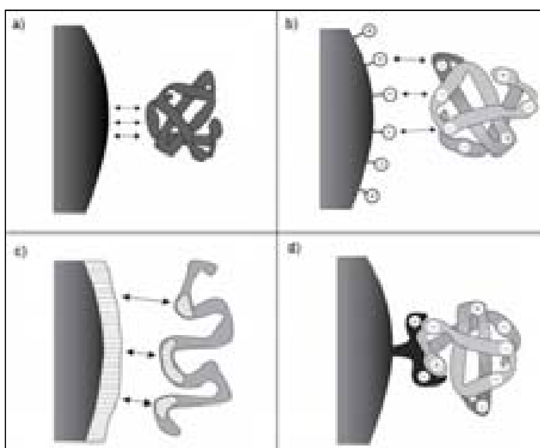


Figura 7.2: Tipos de adsorción. a) Física, b) Iónica, c) Hidrofóbica y d) Afinidad.

7.2.2. Tipos de Adsorbentes

En el establecimiento de un sistema de adsorción es necesario seleccionar cuidadosamente el tipo de adsorbente que se va a utilizar. Las principales características para tomar la decisión son: capacidad, selectividad, regenerabilidad,

cinética, compresibilidad, compatibildad y costo del adsorbente. Estas características están relacionadas con las propiedades físicas y químicas del adsorbente, tales como resistencia mecánica, área por unidad de volumen, porosidad interna, forma, tamaño, composición, carga e hidrofobicidad.

La capacidad de adsorción es la propiedad más importante y es la cantidad de soluto que el adsorbente puede retener por unidad de volumen o masa. La seletividad es una medida de la razón de soluto de interés adsorbido respecto a los contaminantes. Una propiedad importante de los adsorbentes es que puedan ser reutilizados mediante su regeneración con sustancias alcalinas o ácidas. La estructura física (tamaño, forma y tipo de poros) y la composición química de los adsorbentes está relacionada con la cinética de la adsorción. La compresibilidad de los adsorbentes limita la presión de operación en los lechos. La composición química del adsorbente y la solución a manejar deben ser compatibles. El costo del adsorbente es un factor de escalamiento muy importante.

Adsorbentes físicos

Actualmente se utilizan diferentes tipos de adsorbentes en la operación de adsorción. En el caso de la adsorción física, el adsorbente más utilizado en bioseparaciones es el carbón activado (vegetal) y la sílica gel (Fig. 7.3a). Existen varias formas de sílica gel como la de borosilicato poroso y las aereogeles.

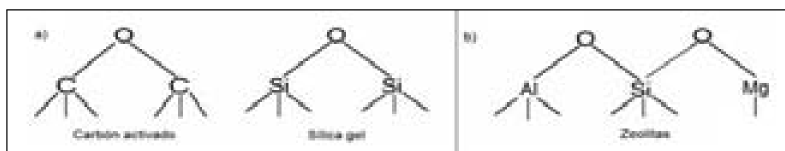


Figura 7.3: Estructuras básicas de adsorbentes. a) Adsorbentes físicos y b) Zeolitas de intercambio iónico

También son utilizadas como adsorbentes físicos resinas sintéticas. Las resinas no polares derivadas del estireno-divinilbenceno son utilizadas para la adsorción de solutos no polares a partir de solventes polares. Las resinas basadas en ésteres acrílicos tienden a ser más efectivas para remover solutos polares de solventes no polares.

Adsorbentes iónicos

Los adsorbentes utilizados en intercambio iónico pueden ser inorgánicos, sintéticos u orgánicos. Los inorgánicos como las zeolitas son poco utilizados para aplicaciones biotecnológicas (Fig. 7.3b). Los adsorbentes iónicos sintéticos están formados por matrices de polímeros unidos lateralmente, como la poliacrilamina, polimetacrilato y el poliestireno devinilbenceno. A la matriz se le unen grupos funcionales que le dan la capacidad de intercambio iónico.

Las resinas de estireno-divinilbenceno catiónicas se producen en un paso por acción de un ácido sobre el grupo benceno (Fig. 7.4). Las aniónicas se producen en dos pasos: Primeramente, se produce una cloro-metilación del benceno. En el segundo paso, se efectúa una aminación. Las matrices de celulosa activada también son muy utilizadas para adsorción por intercambio iónico. Algunas matrices se producen por activación de bases orgánicas como la celulosa.

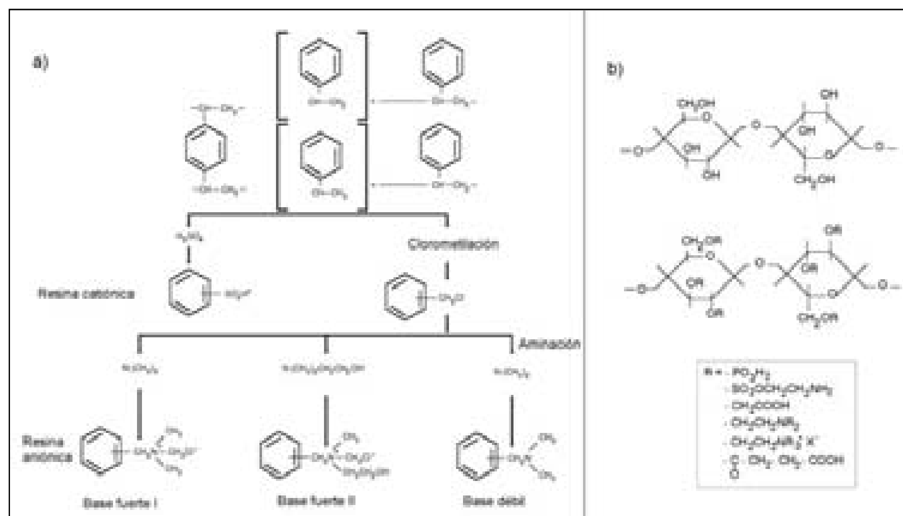


Figura 7.4: Estructura de adsorbentes de intercambio iónico. a) Derivados del estireno-divinil benceno y b) Derivados de celulosa.

Adsorbentes hidrofóbicos

Los adsorbentes hidrofóficos se fabrican de carbohidratos como la agarosa entrecruzada (Sefarosa), dextrano (Sefadex) y celulosa (Celufine). También se utilizan matrices de sílica y polímeros sintéticos. Los ligandos pueden ser alcanos lineales de 1 a 8 carbonos típicamente, grupos aromáticos como el fenilo y ligandos de hidrofobicidad media como el polietilengligol (PEG), polipropilenglicol (PPG) y politetrametilenglicol (PTMG).

Adsorbentes de afinidad

En la adsorción por afinidad el adsorbente consta de dos partes, el soporte o matriz y el ligando. El ligando se une a la matriz por medio de un brazo que evita impedimentos estéricos en un determinado arreglo (Fig. 7.5).

Las matrices utilizadas en la adsorción por afinidad son fabricadas de polímeros naturales y sintéticos como: Celufine, poliacrilamida (o derivados), Sefadex y Sefarosa (Fig. 7.6).

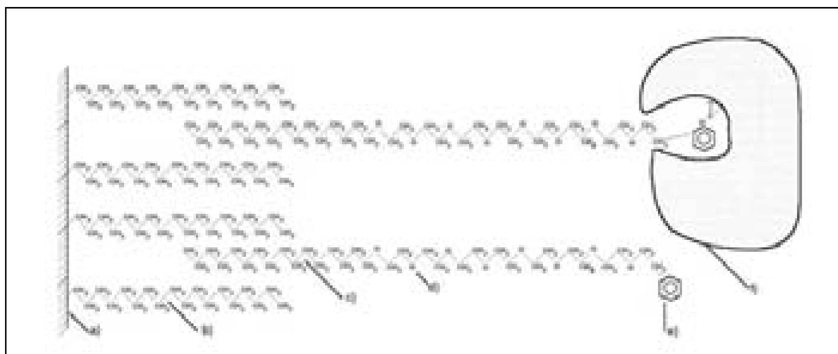


Figura 7.5: Adsorción por afinidad. a) Soporte de sílice, b) Ligando fijo, c) Ligando móvil parte hidrofóbica, d) Ligando móvil parte hidrofílica, e) Piridina y f) Proteína. Fuente: Torres *et al.*, 1988. Reproducida con el permiso de Academic Press.

Propiedades de la matrices En general, es deseable que las matrices sean estables, que presenten grupos funcionales reactivos para la inmovilización de los ligandos, tengan una adecuada permeabilidad, eviten la unión inespecífica del soluto, puedan formar densidades adecuadas de ligandos y su costo sea adecuado. En la Tabla 7.1 se presentan las propiedades particulares de algunas de estas matrices.

Tabla 7.1: Propiedades de matrices.

	Material			
Propiedad	Sílice	Celulosa	Poliacrilamida	Agarosa
Estabilidad	buena	buena	buena	buena
Reactividad	alta	alta	alta	baja
Permeabilidad	buena	baja	buena	buena
Especificidad	baja	baja	baja	alta
No. de ligandos	bajo	bajo	alto	alto
Costo	bajo	bajo	medio	alto

Inmovilización de los ligandos Existen varios procedimientos que se utilizan para inmovilizar el ligando en la matriz, que dependen del tipo de grupo funcional sobre la matriz, el tipo de ligando y de la estabilidad de éstos. Generalmente los grupos funcionales utilizados son hidroxilos, aminos y carbonilos. En la Figura 7.7 se presenta uno de los procedimientos utilizados para activar una matriz de agarosa, lo cual se efectúa mediante dos pasos químicos. Inicialmente

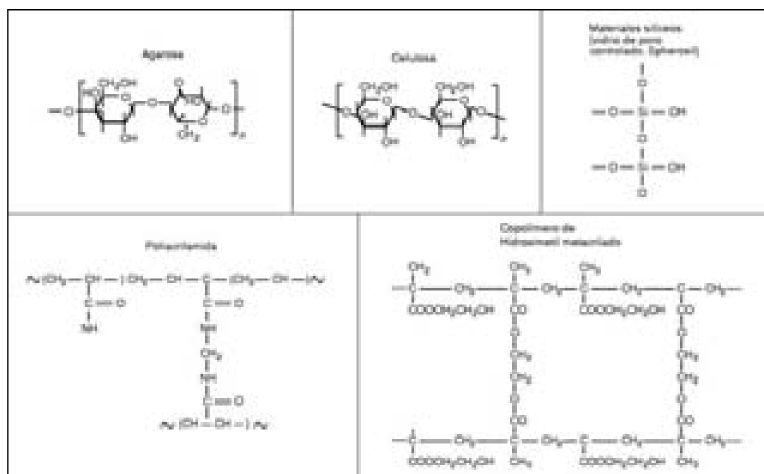


Figura 7.6: Estructura química de algunas matrices comerciales de adsorción por afinidad. Fuente: Yarmush y Colton, 1985.

se activa la matriz con bromuro de cianógeno. Posteriormente se puede unir un radical por medio de un grupo amino para formar un derivado de la isourea.

Tipos de ligandos Los ligandos son moléculas de alta afinidad por el soluto de interés y pueden ser de varios tipos (Fig. 7.8).

a) Bioespecíficos estrictos:
- Sustratos para adsorción de enzimas.
- Antígenos para adsorción de anticuerpos.
- Sondas para obtención de ácidos nucleicos.
- Proteínas acarreadoras para obtención de hormonas.

b) Bioespecíficos amplios: Cofactores y lectinas.

c) Pseudoespecíficos biológicos: Aminoácidos.

d) Pseudoespecíficos no biológicos: Colorantes y metales.

7.2.3. Relaciones de Equilibrio

El análisis de los procesos de adsorción requiere de datos de equilibrio que se expresan normalmente como isotermas de adsorción. Las isotermas son parte esencial para modelar la adsorción y por lo tanto para el diseño, cálculo de eficiencias y costos de la adsorción. Las isotermas nos permiten estimar el grado de recuperación que puede ser alcanzado, la cantidad de adsorbente requerido y la sensibilidad del proceso respecto a la concentración del producto.

En los procesos de adsorción que se presentan en las bioseparaciones existen cuatro tipos básicos de isotermas (Fig. 7.9): a) irreversible, b) Freundlich, c)

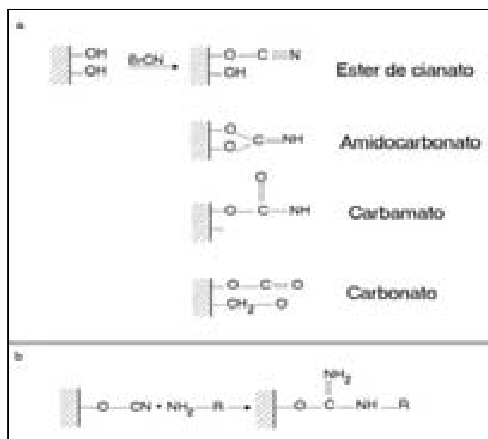


Figura 7.7: Métodos de activación de matrices. a) Activación de matrices con bromuro de cianógeno y b) Reacción del éster de cianato con un derivado amino para obtener un derivado de isourea. Fuente: Yarmush y Colton, 1985. Reproducida con el permiso de Elsevier Science Inc. Copyright ©1985. Todos los derechos reservados.

Langmuir y d) lineal (Hall *et al.,* 1966). Las isotermas irreversibles son características de sistemas altamente específicos. Las isotermas tipo Freundlich normalmente se presentan en sistemas de adsorción por intercambio iónico. La adsorción por afinidad generalmente presenta isotermas tipo Langmuir. La isoterma lineal es menos común, pero puede ser utilizada para aproximar otras isotermas en la región de baja concentración de soluto.

Ecuaciones de las isotermas

La isoterma de Freundlich se describe por medio de una ecuación exponencial empírica de la siguiente forma:

$$q = Kc^n \tag{7.1}$$

donde q es la cantidad de soluto adsorbida (incluyendo el soluto en el líquido de los poros del adsorbente) por cantidad de adsorbente, c es la concentración de soluto en la solución, n es una constante adimensional y K es una constante cuyas unidades dependen de n. Tanto K como n deben ser obtenidas experimentalmente. En este tipo de experimentos generalmente se pone en contacto cantidades iguales del adsorbente con soluciones de soluto de diferentes concentraciones y se mide las concentraciones una vez alcanzado el equilibrio.

Las constantes de la isoterma de Freundlich pueden ser obtenidas por medio de una gráfica log-log de los datos experimentales, determinándose K con la ordenada en el origen y n de la pendiente de la recta que se obtiene.

Cuando las isotermas de adsorción son cóncavas hacia el eje de las abscisas o sea cuando $n < 1$, la isoterma se llama favorable, ya que se puede obtener una

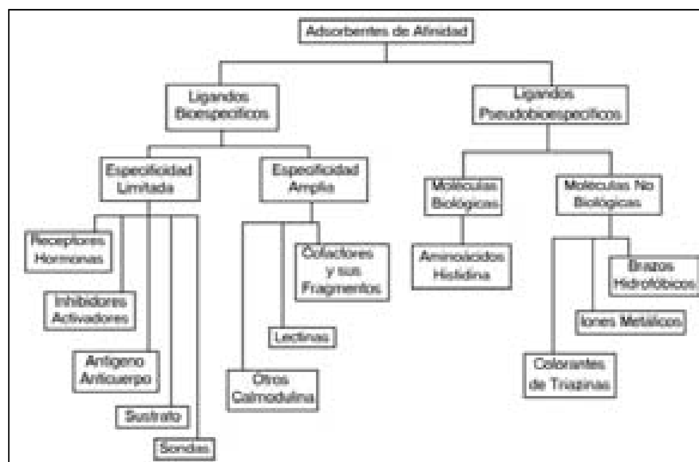


Figura 7.8: Tipos de ligandos en adsorbentes de afinidad. Adaptada de: Vijayalakshmi, 1989.

buena adsorción aún a concentraciones bajas de soluto. Las isotermas cóncavas hacia el eje de las ordenadas o sea para $n > 1$, se llaman desfavorables.

Las isotermas lineales pueden ser descritas por la ecuación de una recta que pasa por el origen de la forma:

$$q = Kc \tag{7.2}$$

en este caso los datos experimentales se grafican en coordenadas cartesianas para determinar K.

Las isotermas tipo Langmuir están dadas por expresiones de la siguiente forma:

$$q = \frac{q_m c}{K_d + c} \tag{7.3}$$

donde q_m es la capacidad máxima del adsorbente y K_d es la constante de equilibrio de desorción. Estas constantes deben ser obtenidas experimentalmente. En este caso es preferible manejar los datos experimentales utilizando la forma recíproca (método del doble recíproco) de la ecuación (7.3):

$$\frac{1}{q} = \frac{K_d}{q_m}\frac{1}{c} + \frac{1}{q_m} \tag{7.4}$$

de tal manera que en una gráfica cartesiana de $1/q$ vs $1/c$, se puede obtener una recta de pendiente K_d/q_m y ordenada en el origen $1/q_m$. Las unidades de q_m y K_d de esta isoterma son las mismas que las de q y c, respectivamente.

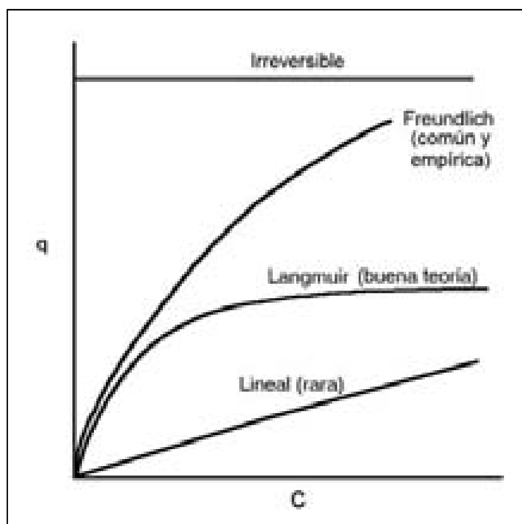


Figura 7.9: Isotermas de adsorción más comunes. Fuente: Belter *et al.*, 1988.

Un caso particular de la isoterma de Langmuir se presenta cuando K_d es muy pequeña y la adsorción es irreversible. En este caso $q = q_m$ para cualquier valor de c.

Mecanismo de la isoterma de Lagmuir

La forma de las isotermas de Langmuir puede explicarse mediante un mecanismo teórico bien fundamentado. Se propone que sobre la superficie del adsorbente existen sitios específicos en los que las partículas de soluto se unen reversiblemente. En un momento dado durante la adsorción, coexisten sitios ocupados por soluto y sitios vacíos. La adsorción en el sentido directo es proporcional a la concentración de soluto y a la concentración de sitios vacíos. En el sentido inverso la adsorción es proporcional a la concentración de sitios ocupados.

De acuerdo a lo anterior, la adsorción puede ser expresada en forma de una ecuación química de la siguiente forma:



$$\text{soluto} + \text{sitios vacíos} \rightleftharpoons \text{sitios ocupados} \tag{7.5}$$

En el equilibrio se puede definir una constante de equilibrio de desorción K_d de acuerdo con la siguiente expresión:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[\text{soluto}][\text{sitios vacíos}]}{[\text{sitios ocupados}]} \tag{7.6}$$

El número total de sitios activos para la adsorción es constante e igual al número de sitios vacíos más los sitios ocupados o sea:

$$[\text{sitios totales}] = [\text{sitios vacíos}] + [\text{sitios ocupados}] \tag{7.7}$$

Combinando las ecuaciones (7.6) y (7.7) se puede obtener la expresión:

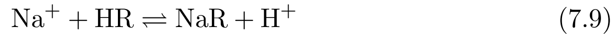
$$[\text{sitios ocupados}] = \frac{[\text{sitios totales}][\text{soluto}]}{K_d + [\text{soluto}]} \tag{7.8}$$

debido a que q es proporcional a la concentración de sitios ocupados y q_m a la concentración de sitios totales, la ecuación (7.3) puede ser obtenida a partir de la expresión (7.8), es decir este mecanismo fundamenta la expresión de Langmuir.

Mecanismo de intercambio iónico

Las isotermas de intercambio iónico pueden ser racionalizadas en forma análoga. Sin embargo, en este caso los sitios de adsorción en un momento dado, o están ocupados por el ión de soluto o están ocupados por el ión que normalmente está unido a la superficie del adsorbente. La expresión final depende del número de iones de soluto que se intercambian por ión de adsorbente.

En el caso de un intercambio monovalente característico de las resinas sintéticas la adsorción puede ser expresada como:



$$\mathrm{Na^+ + HR \rightleftharpoons NaR + H^+} \tag{7.9}$$

donde HR representa los sitios de intercambio iónico en estado normal del adsorbente, y NaR representa los sitios de intercambio una vez que ha sido intercambiado el ión de soluto. En equilibrio la constante de desorción está dada por:

$$K_d = \frac{[\mathrm{Na^+}][\mathrm{HR}]}{[\mathrm{NaR}][\mathrm{H^+}]} \tag{7.10}$$

La concentración de radicales R^- totales en la superficie del adsorbente está dada por:

$$[\mathrm{R^-}] = [\mathrm{NaR}] + [\mathrm{HR}] \tag{7.11}$$

Combinando las ecuaciones (7.10) y (7.11) se puede obtener la ecuación:

$$[\mathrm{NaR}] = \frac{[\mathrm{R^-}][\mathrm{Na^+}]}{K_d[\mathrm{H^+}] + [\mathrm{Na^+}]} \tag{7.12}$$

como q es proporcional a [NaR] y q_m es proporcional a $[\mathrm{R^-}]$, la adsorción iónica monovalente puede ser descrita por medio de una expresión tipo Langmuir, siempre y cuando la concentración $[\mathrm{H^+}]$ permanezca constante; como en el caso de que se utilice una solución amortiguadora. En el caso de adsorciones iónicas no monovalentes el análisis análogo frecuentemente conduce a expresiones tipo Freundlich.

Ejemplo 7.1. Adsorción de Albúmina de Suero de Bovino (ASB) a pH = 7 en un adsorbente aniónico Q-Sefarosa.

Los datos de equilibrio de la adsorción de ASB en Q-Sefarosa se presentan en la siguiente tabla (Draeger y Chase, 1990.)

c (mg/mL)	q (mg/mL)	$Log(c)$	$Log(q)$	$1/c$	$1/q$
0.05	30.00	-1.30	1.477	20.00	0.0333
0.10	43.70	-1.00	1.640	10.00	0.0229
0.20	56.53	-0.70	1.752	5.00	0.0177
1.00	73.85	0.00	1.868	1.00	0.0135
2.00	76.81	0.30	1.885	0.50	0.0130
4.00	78.37	0.60	1.894	0.25	0.0128

Se pide: Encontrar la expresión matemática de la isoterma que mejor ajusta los datos.

Solución:

La solución se presenta en forma gráfica en la Figura 7.10. De acuerdo con la Figura 7.10a, una isoterma lineal no se ajusta a los datos. La gráfica log-log de los datos (Fig. 7.10b) no produce una línea recta, por lo que la isoterma no es del tipo Freundlich. Utilizando el método del doble recíproco se encuentra que la isoterma de Langmuir presenta un buen ajuste a los datos (Fig. 7.10c). La ordenada en el origen es 0.0125, entonces $q_m = 80$ mg/mL. La pendiente de la recta es igual a 1.0×10^{-3}, por lo que $K_d = 0.08$ mg/mL. En la Figura 7.10d se presentan los datos experimentales y la línea continua representa el modelo de Langmuir ajustado.

7.2.4. Cinética de la Adsorción

El estudio de las isotermas de adsorción nos permite determinar para un sistema soluto-adsorbente dado, el grado de separación que puede ser logrado y la sensibilidad del proceso con respecto a la concentración del soluto. Sin embargo, para el desarrollo de un modelo de la adsorción es necesario poder obtener, mediante el empleo de coeficientes de transferencia de masa, la velocidad de la adsorción o el tiempo necesario para alcanzar una cierta separación. Este tipo de modelos pueden ser empleados para el diseño y optimización de la operación de adsorción (Fig. 7.11).

En el caso que la adsorción sea bastante rápida, el sistema permanecerá esencialmente en equilibrio y los modelos se simplifican. En la mayoría de los casos las interacciones soluto-adsorbente no ocurren instantáneamente.

La velocidad efectiva de la adsorción depende de las condiciones de operación (flujo, temperatura, composición y presión), de la configuración del sistema (por lotes, columna, etc.) y del tamaño del equipo donde se realizará la operación. El estudio de estos efectos se divide en dos grandes conceptos:

a) Los mecanismos de transporte (físicos y químicos).

b) Los efectos de mezclado.

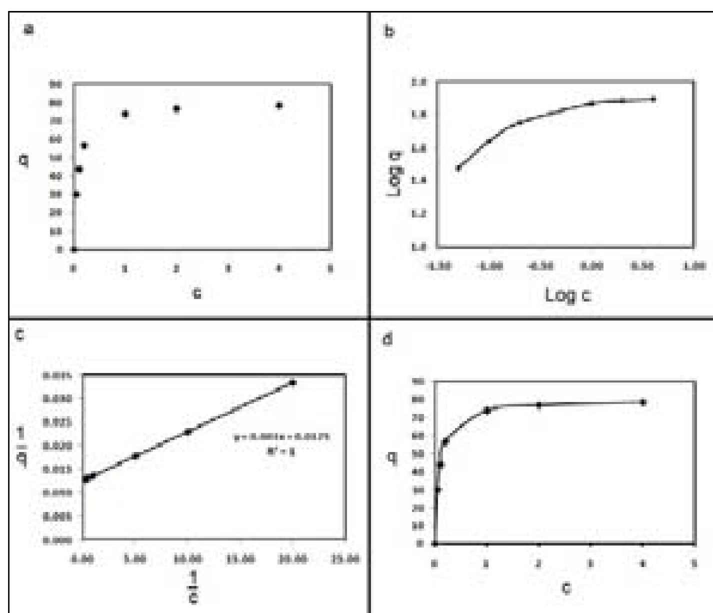


Figura 7.10: Solución gráfica del Ejemplo 7.1. a) Datos experimentales, b) Isoterma de Freundlich, c) Isoterma de Langmuir y d) Datos y modelo ajustado de Lagmuir.

Mecanismos de transporte

El estudio de los mecanismos de transporte consiste en establecer las expresiones de la rapidez de la adsorción a nivel local, es decir considerando el comportamiento de una partícula de adsorbente o un elemento de volumen de un sistema.

En los procesos de adsorción se utilizan materiales porosos que ofrecen una gran área por unidad de volumen con el propósito de recuperar la mayor cantidad de soluto posible en un volumen dado. Para que una partícula de soluto pueda ser adsorbida en la superficie de un poro del adsorbente, el soluto tiene que pasar del seno de la fase líquida a la superficie del adsorbente (Fig. 7.12).

Varias resistencias al movimiento del soluto existen en este proceso que pueden visualizarse principalmente como:

a) Resistencia de la película del líquido que rodea el adsorbente. Primero el soluto difunde desde el seno del líquido a través de la película de líquido que rodea a la partícula de adsorbente.

b) Resistencia a la difusión en el seno del adsorbente. En algunos tipos de adsorbentes el soluto difunde a través del seno del adsorbente. A este fenómeno se le conoce como difusión en la fase del adsorbente.

c) Resistencia a la difusión dentro del poro. Debido a que el área de la super-

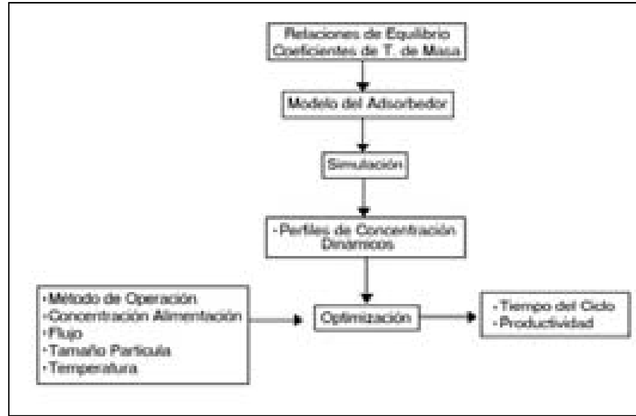


Figura 7.11: Diseño de adsorbedores. Adaptada de: Wang, 1990. Reproducida con el permiso de Marcel Dekker Inc. Copyright ©1990. Todos los derechos reservados.

ficie interior del poro es mucho mayor que la superficie exterior, generalmente la adsorción se efectúa principalmente dentro del poro, por lo que el soluto debe difundir a través del líquido al interior de los poros.

d) Resistencia a la reacción en la superficie. El soluto una vez situado en el sitio de adsorción se une a éste por medio de una reacción de superficie, la cual es un proceso finito pero generalmente más rápido que los procesos anteriores.

Control de la resistencia en la película Las resistencias anteriores actúan combinadas en serie y en paralelo como puede apreciarse en la Figura 7.12. Particularmente, la resistencia de la difusión en el poro puede relacionarse directamente con las otras dos. Generalmente la resistencia de la película o la del poro o una combinación de ambas, controla la velocidad de adsorción local.

Cuando la resistencia de la película es mucho mayor que la del poro o la de la reacción de superficie, la velocidad de adsorción está controlada a nivel local por el flujo del soluto a través de la película que rodea al adsorbente. En este caso la velocidad de adsorción puede expresarse como:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_L a(c - c^*) \tag{7.13}$$

donde:

k_L: Coeficiente de transferencia de masa. $[M/(T - L^2 - M/L^3 \text{ líquido})]$.

a: Área específica del adsorbente. $[L^2/L^3]$.

c: Concentración de soluto en el seno de la fase líquida. $[M/L^3]$.

c^*: Concentración hipotética de soluto en el líquido, en equilibrio con la concentración de soluto en el adsorbente. $[M/L^3]$.

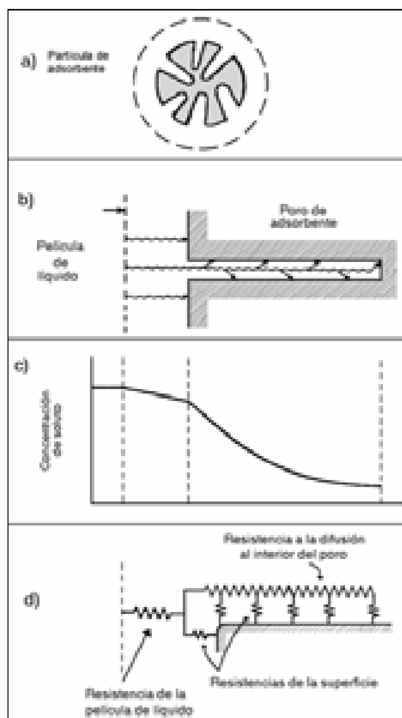


Figura 7.12: Resistencias en la adsorción. a) Partícula adsorbente, b) Poro de adsorbente, c) Perfil de concentración del soluto en la partícula y d) Analogía de resistencias. Adaptada de: Levenspiel, 1962.

El parámetro a puede ser correlacionado con el diámetro de la partícula de adsorbente d_p de acuerdo a la expresión:

$$a = \frac{6}{d_p} \tag{7.14}$$

La resistencia de la película por sí misma rara vez controla la rapidez de la transferencia de masa, excepto en los casos en que la partícula de adsorbente es pequeña y la difusividad en el poro grande.

Estimación del coeficiente de transferencia de masa en la película Para sistemas de adsorción en columnas, el coeficiente de transferencia de masa k_L generalmente se puede correlacionar con una expresión de la forma:

$$Sh = C_1 + C_2(Re)^a(Sc)^b \tag{7.15}$$

donde C_1, C_2, a y b son constantes. Sh, Re y Sc, son los números adimensionales de Sherwood, Reynolds y Schmidt dados por las siguientes relaciones:

$$Sh = \frac{k_L d_p}{D_{AB}} \tag{7.16}$$

$$Re_p = \frac{d_p \nu \rho_L}{\mu_L} \tag{7.17}$$

$$Sc = \frac{\mu_L}{\rho_L D_{AB}} \tag{7.18}$$

En el caso de adsorción de biomoléculas se han utilizado las siguientes correlaciones para estimar k_L:

En tanques agitados (Geankoplis, 1983):

$$k_L = \frac{2D_{AB}}{d_p} + 0.31 \left(\frac{\mu_L}{\rho_L D_{AB}}\right)^{-2/3} \left(\frac{\Delta\rho\mu g}{\rho_L^2}\right)^{1/3} \tag{7.19}$$

En columnas (Foo y Rice, 1975):

$$Sh = 2 + 1.45 Re_p^{1/2} Sc^{1/3} \tag{7.20}$$

Estimación de la difusividad También existen correlaciones para estimar difusividades de biomoléculas, como la utilizada para proteínas (Polson 1950),

$$D_{AB} = 9.4 \times 10^{-15} \frac{T}{\mu_L (M_A)^{1/3}} \tag{7.21}$$

y para pDNA (Prazeres, 2008):

$$D_{AB} = 3.31 \times 10^{-15} \frac{T}{\mu_L (pb)^{2/3}} \tag{7.22}$$

donde:

D_{AB}: Difusividad. [m^2/s].

ν: Velocidad superficial del líquido (Flujo/Área). [m/s]

μ: Viscosidad. [kg/m−s].

T: Temperatura. [°K].

M_A: Peso molecular soluto.

bp: Número de pares de bases del plásmido.

Control de la difusión del soluto en el seno del adsorbente La difusión en la fase sólida del soluto una vez que ha pasado del seno del líquido a la fase sólida, se presenta en algunos sólidos homogéneos permeables como las resinas que se utilizan en intercambio iónico o en adsorbentes con porosos cubiertos con películas móviles, o en líquidos utilizados para impregnar la partícula porosa. Considerando una geometría esférica uniforme el balance de soluto en la partícula está dado por:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = D_s \left(\frac{\partial^2 q}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial q}{\partial r} \right) \tag{7.23}$$

donde:

D_s: Difusividad efectiva del soluto en la fase sólida. $[(L^2/t)]$.

r: Coordenada radial al interior de la partícula. $[L]$.

q: Concentración de soluto en la fase sólida. $[M/L^3]$.

Fuerza impulsora lineal en la superficie (LDF) La ecuación (7.23) suele ser aproximada utilizando una fuerza impulsora lineal expresándose de la siguiente forma:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_s a(q^* - q) \tag{7.24}$$

donde q^* es una concentración hipotética de equilibrio con la concentración de soluto en el seno de la fase líquida, y el parámetro k_s es el coeficiente de transferencia de masa que se correlaciona con la difusividad mediante la ecuación:

$$k_s a = \frac{60 D_s}{d_p^2} \tag{7.25}$$

Control de la difusión del soluto en la fase líquida al interior de los poros Cuando la velocidad de adsorción está controlada por la difusión del soluto al interior de los poros de la partícula de adsorbente, hasta el sitio de adsorción, el balance de soluto al interior de la partícula está dado por la expresión:

$$\varepsilon_i \frac{\partial c_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_i \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial c_i}{\partial r} \right) - (1 - \varepsilon_i)\frac{\partial q_i}{\partial t} \tag{7.26}$$

c_i: Concentración de soluto en la fase líquida al interior del poro. $[M/L^3]$.

q_i: Concentración de soluto en la fase sólida. $[M/L^3]$.

D_i: Difusividad del soluto al interior del poro. $[L^2/t]$.

ε_i: Porosidad de la partícula al soluto de interés. $[L^3/L^3]$.

En el caso en que la acumulación del soluto al interior del poro sea mucho menor que la velocidad de la adsorción, la ecuación (7.26) puede ser escrita como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \left(\frac{\varepsilon_i}{1-\varepsilon_i}\right) D_i \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial c_i}{\partial r}\right) \tag{7.27}$$

para líquidos la difusividad D_i puede ser expresada como:

$$D_i = \frac{D_{AB}}{\Gamma_o} \tag{7.28}$$

donde Γ_o es la tortuosidad del adsorbente (una medida de la estructura de los poros) y D_{AB} es la difusión molecular del soluto en un líquido libre de adsorbente.

Fuerza impulsora lineal en el poro (LDF) La ecuación (7.27) puede aproximarse utilizando una fuerza impulsora lineal para obtener la ecuación siguiente:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_p a(q^* - q) \tag{7.29}$$

donde q^* es una concentración hipotética de equilibrio con la concentración de soluto en el seno de líquido , q es la concentración promedio de soluto en el adsorbente. El coeficiente $k_p a$ puede correlacionarse con la difusividad efectiva del poro mediante la siguiente expresión:

$$k_p a = \frac{60\varepsilon_i D_i}{d_p^2} \tag{7.30}$$

Control de la reacción de superficie Generalmente la reacción de adsorción en la superficie del adsorbente es mucho más rápida que los otros mecanismos y rara vez es el mecanismo controlante. En las expresiones cinéticas más utilizadas la reacción de superficie es tratada como una reacción química, reversible o irreversible, de un cierto orden.

Dos expresiones comúnmente utilizadas principalmente para sistemas de intercambio iónico, son:

Cinética reversible de primer orden:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \varepsilon k_1 c - k_{-1} q \tag{7.31}$$

Cinética reversible de segundo orden:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_1 c(q_m - q) - k_{-1} q \tag{7.32}$$

donde k_1 y k_{-1} son las constantes cinéticas de adsorción y desorción, respectivamente. El parámetro q_m es la capacidad máxima de adsorción del adsorbente.

Efectos de mezclado

La velocidad de adsorción efectiva también puede disminuir por efectos de un mezclado imperfecto. Esta situación es característica de columnas largas donde se presentan irregularidades en el flujo (canalamiento) o en el mezclado (espacios muertos, difusión molecular o dispersión axial).

En la construcción de algunos modelos de adsorción no se consideran los efectos de mezclado y de flujo no ideal. Sin embargo, debido a que en el proceso de escalamiento de columnas este efecto puede ser importante, es necesario considerar algunos aspectos fundamentales de este fenómeno.

Uno de los modelos más utilizados para describir la desviación del comportamiento ideal del flujo al interior de columnas, es el modelo de flujo tapón con dispersión (Fig. 7.13), donde los efectos de la dispersión axial debida a remolinos y de la difusión molecular, se agrupan en el concepto del coeficiente efectivo de dispersión axial, en función del cual se puede definir un coeficiente aparente de transferencia de masa dado por:

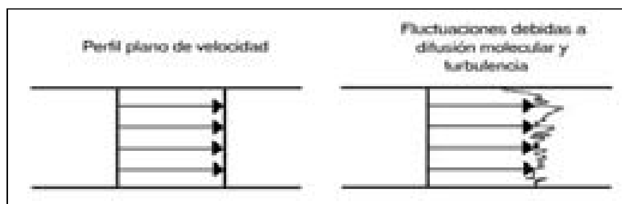


Figura 7.13: Modelo de flujo tapón con dispersión. Adaptada de: Levenspiel, 1962. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons. Copyright ©1962. Todos los derechos reservados.

$$k_d a = \frac{\nu^2}{D_{ax}} \tag{7.33}$$

donde:

D_{ax}: Coeficiente de dispersión axial. $[L^2/t]$.

ν: Velocidad superficial de flujo. $[L/t]$.

Es conocido que para flujo laminar de líquidos en lechos empacados (caso más común) el número de Reynolds basado en el diámetro de las partículas del lecho es menor a 10. Bajo esta consideración el número de Peclet (el cual es una medida del grado de dispersión en la columna) toma un valor constante de 2 (Fig. 7.14) entonces,

$$Pe = \frac{d_p \upsilon}{D_{ax}} = 0.5 \tag{7.34}$$

donde Pe es el número de Peclet (adimensional). Las ecuaciones (7.33) y (7.34) permiten obtener una expresión para el coeficiente aparente de transferencia de

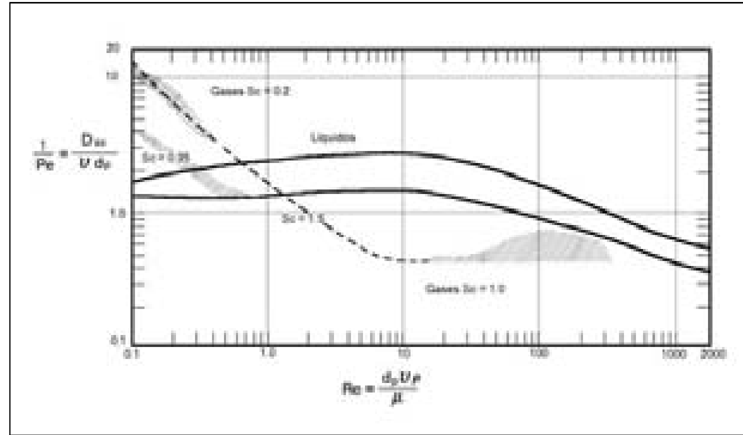


Figura 7.14: Dispersión en lechos empacados. Adaptada de: Levenspiel, 1962.

masa por dispersión, de tal manera que la expresión de la velocidad de adsorción se puede aproximar a:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_d a(c - c^*) \tag{7.35}$$

7.3. Equipos de Adsorción

Las operaciones de adsorción pueden llevarse a cabo en tanques agitados, por lotes o continuos (Fig. 7.15). Este tipo de sistemas son poco usados a nivel industrial por incosteables, pero resultan muy útiles en la experimentación de laboratorio para la obtención de datos de diseño.

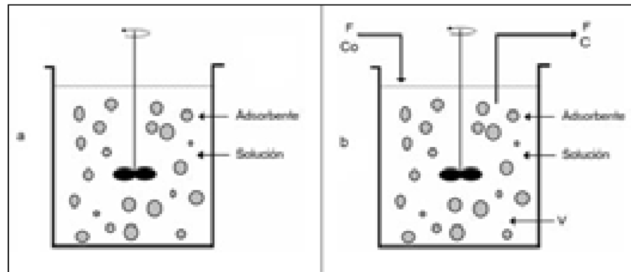


Figura 7.15: Sistemas de adsorción tipo tanque agitado. a) Por lotes y b) Continuo.

Los equipos industriales de adsorción más empleados son los tipo columna de lecho fijo. Estas columnas pueden ser operadas simulando un sistema a contracorriente mediante el sistema de carrusel (Fig. 7.16). En este tipo de arreglo se cuenta con varias columnas operando en serie. Cuando se agota la columna que está siendo alimentada, se avanza la posición de la alimentación a la siguiente columna, simulándose una operación a contracorriente. La columna agotada se descarga y posteriormente se convierte en la columna final de la serie.

En los equipos de lecho fluidizado las partículas de adsorbente se suspenden mediante un flujo ascendente de la solución de interés. Este tipo de arreglo se considera útil para el tratamiento directo de caldos con sólidos en suspensión, suprimiendo la operación sólido-líquido previa a la adsorción. Con esta misma intención existen desarrollos donde se emplea una combinación de un tanque adsorbedor y uno desorbedor operando en forma continua (Fig. 7.17).

7.4. Diseño de Adsorbedores

El diseño de adsorbedores mediante modelos (Fig. 7.11) permite estimar algunos parámetros importantes como: a) concentración de soluto al final de la adsorción (eficiencia y pérdidas), b) tiempo necesario para llevar a cabo el proceso, c) cantidad de adsorbente necesario y d) etapas necesarias o longitud de una columna.

Como se estableció en la introducción de este capítulo la formulación del modelo requiere de los datos de equilibrio del sistema, las expresiones de la velocidad de adsorción, los balances y las condiciones de frontera. En las secciones 7.2 y 7.3 se han revisado los primeros dos aspectos. En esta sección se revisa la integración de estos cuatro aspectos en el diseño de arreglos específicos de sistemas de adsorción, debido a que los balances y condiciones de frontera son característicos de cada tipo de arreglo. En general los arreglos más comúnmente empleados son:

- El tanque agitado por lotes.
- El tanque agitado con alimentación continua.
- Las columnas empacadas de lecho fijo.

7.4.1. Adsorbedores Tipo Tanque Agitado por Lotes

En una operación de adsorción tipo tanque agitado intermitente el adsorbente se agrega a la solución dentro de un tanque, se agita la suspensión y posteriormente se separa la fase líquida y sólida. Las operaciones de este tipo son utilizadas para el procesamiento integral de caldos, operaciones lote específicas o cuando la capacidad del adsorbente es muy alta.

Gran parte de los datos de equilibrio o las cinéticas de adsorción para otro tipo de diseños son obtenidos en sistemas por lotes. Es importante mencionar que en algunos casos, las operaciones de lavado y elución se realizan en tanques agitados en forma intermitente.

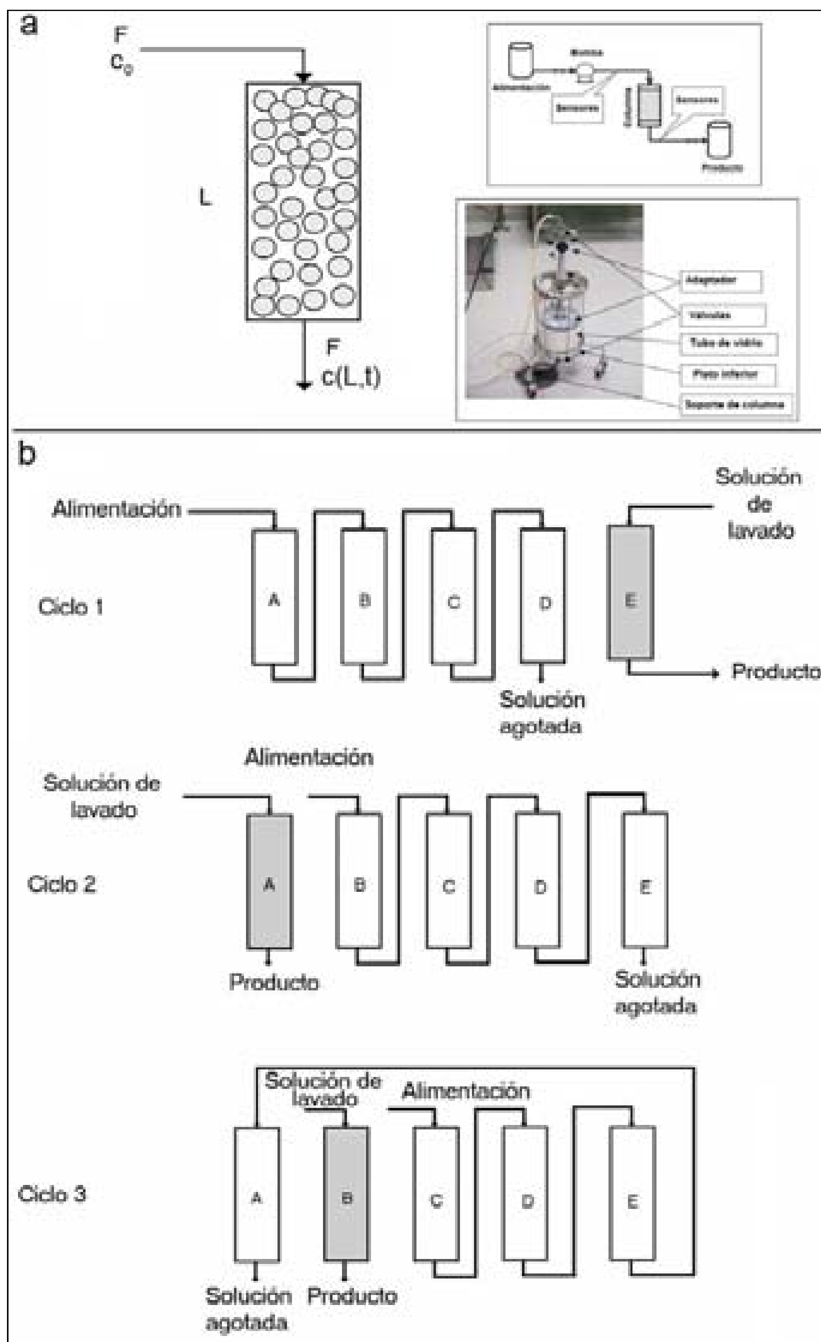


Figura 7.16: Adsorción en columnas, a) Columna de lecho fijo y b) Sistema de Carrusel.

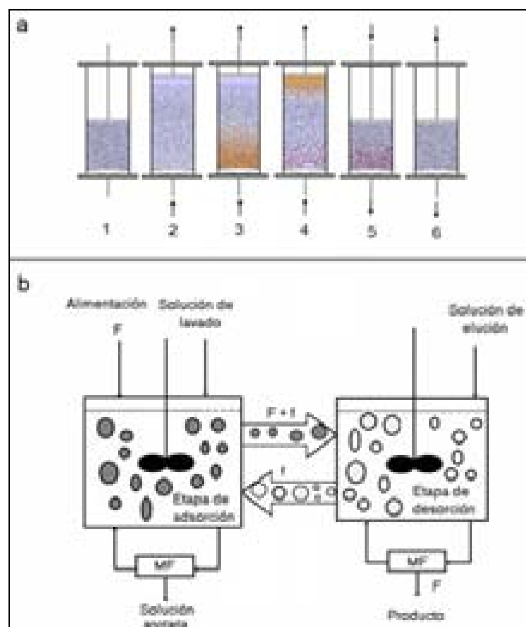


Figura 7.17: Adsorción en caldos completos. a) Lecho fluidizado. 1) adsorbente sedimentado, 2) equilibrio, 3) alimentación, 4) lavado, 5) elución y 6) regeneración. b) Adsorción continua con recirculación de adsorbente. Adaptada de: Gailliot *et al.*, 1990 y Pungor *et al.*, 1987. Reproducida con el permiso de la American Chemical Society. Copyright ©1990 y con el permiso de Nature Publishing Co. Copyright ©1987. Todos los derechos reservados.

Métodos de análisis de sistemas de adsorción por lotes

Actualmente existe una gran diversidad de modelos para describir la adsorción en sistemas por lotes debido a los diferentes mecanismos que pueden controlar la velocidad de transferencia de masa entre las fases (película, poro, resistencias combinadas, etc.) y a la forma de la curva de equilibrio (lineal, Langmuir, etc.) que también introduce variabilidad al modelo. Entre los principales métodos para el análisis del sistema de adsorción en esta sección se describen los siguientes:

a) Métodos gráficos.

b) Métodos basados en la teoría cinética.

i) Modelo de tres resistencias.

ii) Modelo de parámetros agrupados.

iii) Modelo de control en la película y relación de equilibrio tipo Langmuir.

Análisis gráfico de la adsorción por lotes en equilibrio

Considérese una operación tipo tanque agitado por lotes como se muestra en la Figura 7.18. Si se proporciona un tiempo de contacto adecuado se alcanza el equilibrio entre las fases. Por otro lado, si el tiempo de contacto es menor que el necesario para alcanzar el equilibrio la operación no será 100 % eficiente. En el caso de adsorciones lentas, una alternativa de diseño es utilizar curvas de equilibrio prácticas que tomen en cuenta directamente la eficiencia de etapa, considerando tiempos de contacto menores a los del equilibrio real.

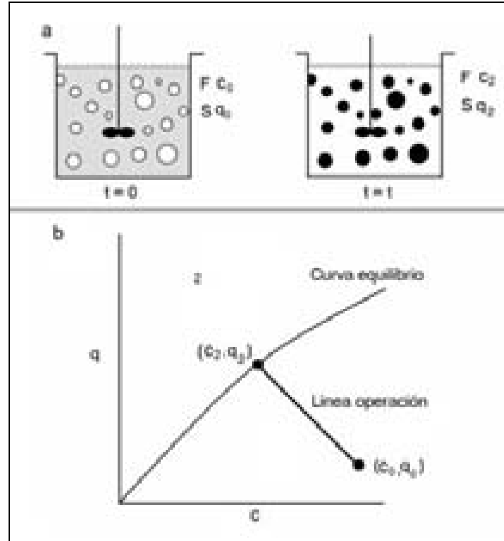


Figura 7.18: Adsorción por lotes. a) Proceso y b) Curvas de equilibrio y operación.

En el análisis que sigue se considera que cada etapa es una etapa ideal, por lo tanto el adsorbente y la solución están en equilibrio al término de la operación (o bien una etapa real si se utilizan curvas de equilibrio modificadas). Bajo esta consideración el análisis de este tipo de operación se simplifica, y sólo requiere de la combinación de las expresiones de equilibrio y los balances de masa, ya sea en forma gráfica o en forma analítica.

La expresión de equilibrio es la isoterma que depende de cada tipo de adsorción, por ejemplo:

$$q = Kc^n \tag{7.36}$$

El balance de masa del soluto de acuerdo a la Figura 7.18 puede ser expresado como:

$$Fc_0 + Sq_0 = Fc_2 + Sq_2 \tag{7.37}$$

donde F es la cantidad de la fase líquida y S la cantidad de adsorbente (se suponen constantes como es el caso para soluciones diluidas de caldos biológicos), c_0 y c_2 son las concentraciones de soluto en el líquido al inicio y final del proceso, respectivamente. Asimismo, q_0 y q_2 son las concentraciones de soluto en el adsorbente al inicio y final del proceso.

La ecuación (7.37) puede expresarse como la ecuación de una línea recta, llamada línea de operación,

$$q_2 = q_0 + \frac{F}{S}(c_0 - c_2) \tag{7.38}$$

La solución gráfica de las ecuaciones (7.36) y (7.38) se representa en la Figura 7.18b, donde la curva de equilibrio utilizada refleja una adsorción favorable ($n < 1$). La intersección de la curva de equilibrio con la línea de operación permite calcular las concentraciones de equilibrio (c_2, q_2) al final del proceso.

Ejemplo 7.2. Adsorción de estreptomicina.

La estreptomicina se recupera utilizando adsorción por intercambio catiónico. Se ha observado que 1.56 g de este antibiótico pueden ser adsorbidos por cada gramo de resina. Debido a que la curva de equilibrio es muy favorable para este proceso; sólo cuando la concentración en la solución es muy baja, la concentración del soluto en el adsorbente es menor de este valor ($q < q_m$).

Se pide:

Estimar la cantidad de resina necesaria para procesar $100,000$ L de un caldo de fermentación que contiene 6 g/L de estreptomicina en una operación por lotes.

Solución:

El balance de masa para esta operación es:

$$S(q_2 - q_0) = F(c_0 - c_2)$$

con los valores: $q_0 = 0$; $q_2 = 1.56$ g/g; $c_2 = 0$, se puede calcular S:

$$S = \frac{Fc_0}{q_2} = \frac{100,000 \text{ L} \times 6 \ \frac{\text{g}}{\text{L}}}{1.56 \ \frac{\text{g}}{\text{g}}} = 384,615 \text{ g de adsorbente}$$

Como puede observarse se requiere una gran cantidad de adsorbente. Esto implica que sería adecuada una operación continua, sin embargo el problema que significa el movimiento continuo de los sólidos, conlleva a utilizar con más frecuencia operaciones semi-continuas.

Ejemplo 7.3. Adsorción de fenilalanina.

La adsorción de fenilalanina en un adsorbente de poliestireno (amberlita XAD-2) puede ser descrita por la siguiente isoterma:

$$q = 6.1 \times 10^{-3} \ c^{0.9}$$

donde q tiene unidades de g/g y c de g/L. En una operación por lotes se ponen en contacto 300 g de adsorbente con 2.0 L de solución que contiene 15 g/L de fenilalanina.

Se pide estimar:

a) Las composiciones en el equilibrio.

b) El porcentaje de recuperación.

Solución:

Utilizando el método gráfico el balance de masa para esta operación (ecuación 7.38), permite encontrar la ecuación de la línea de operación.

$$q_2 = 0 + \frac{2}{300}(15 - c_2)$$

a) La curva de operación y de equilibrio se grafican en la Figura 7.19, el punto donde intersectan representa las condiciones al final de la operación, por lo tanto:

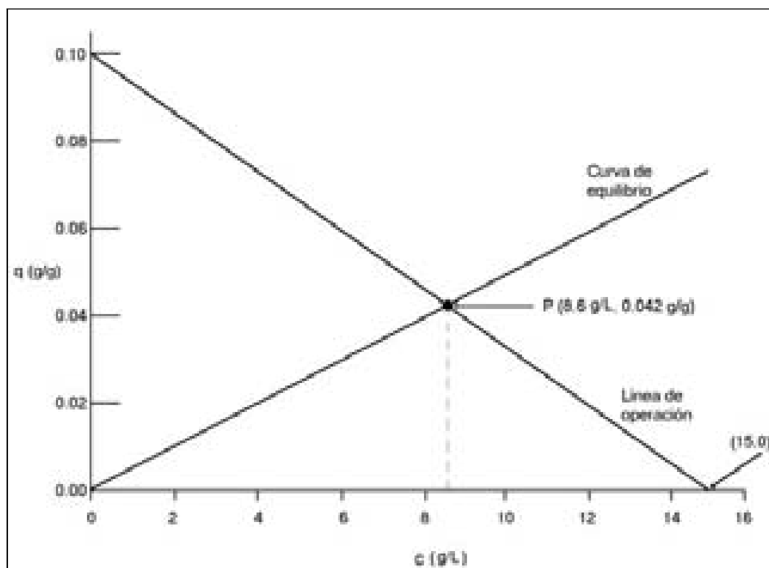


Figura 7.19: Solución gráfica del Ejemplo 7.3.

$$\begin{aligned} q_2 &= 0.042 \text{ g/g} \\ c_2 &= 8.6 \text{ g/L} \end{aligned}$$

b) El porcentaje de recuperación puede ser expresado como:

$$R_E = \frac{Fc_0 - Fc_2}{Fc_0} \times 100 = \frac{c_0 - c_2}{c_0} \times 100 = \frac{15 - 8.6}{15} \times 100 = 43\,\%$$

Ejemplo 7.4. Adsorción de Desacetilcefalosporina C (DAC-C) utilizando amberlita XAD-2 modificada.

La principal impureza en el proceso de obtención de cefalosporina C es la DAC-C. La isoterma de adsorción de esta impureza en amberlita XAD$-$2$-CH_2$-CH_2-Br, a un pH de 2.8, está dada por la siguiente expresión:

$$q = 0.087c$$

donde q está en g/g y c en g/L.

Se pide:

Si se utiliza un proceso por lotes en equilibrio, ¿qué cantidad de adsorbente es necesario agregar a 2.0 L de una solución de DAC-C con una concentración de 2 g/L, para recuperar el 90 % de la impureza?

Solución:

Debido a que la isoterma es lineal se facilita una solución analítica al problema. Del balance de masa se obtiene:

$$q_2 = \frac{2}{S}\,(2 - c_2)$$

en el equilibrio:

$$q_2 = 0.087\ c_2$$

y de acuerdo con la recuperación deseada, $c_2 = 0.1c_0$.

Combinando las dos expresiones anteriores se puede encontrar la intersección de la curva de operación con la de equilibrio,

$$q_2 = 0.0174 \text{ g de soluto/g de adsorbente}$$

$$c_2 = 0.2\ g \text{ de soluto/L}$$

del balance de masa,

$$S = 206.9 \text{ g}$$

Teoría cinética

Gran parte de la información necesaria para evaluar el comportamiento de los procesos adsorción está contenida en las curvas de los perfiles de concentración (c vs t). Estas curvas pueden ser utilizadas para determinar: a) la capacidad del adsorbente que ha sido utilizada, b) la cantidad de soluto que no se adsorbe al final de la operación y c) el tiempo de proceso. Asimismo, para estudiar el efecto de las variables de operación sobre el comportamiento del sistema. Un modelo matemático que pueda usarse para predecir apropiadamente este comportamiento dinámico, proporciona una forma práctica de obviar muchos experimentos, además de ayudar en el diseño y escalamiento de los procesos de adsorción.

Los modelos para predecir perfiles de concentración en sistemas de adsorción en lotes que se enmarcan dentro de la teoría cinética, se desarrollan mediante la combinación de balances de masa, relaciones de equilibrio, relaciones de transferencia de masa entre las fases y las condiciones iniciales y de frontera del sistema.

El modelo físico consiste en la adsorción isotérmica de un soluto sobre partículas esféricas de adsorbente de radio promedio, r_m, y porosidad, ε_i (Fig. 7.20). La operación se supone se conduce en un tanque bien agitado con un volumen de sistema V. El volumen de líquido externo a la matriz de adsorbente es $\varepsilon_b V$ y el volumen de adsorbente es $(1-\varepsilon_b)V$. Las concentraciones inicial y transiente de soluto en el seno del líquido son c_o y $c(t)$, respectivamente. La concentración de soluto en el líquido de los poros y en la superficie del adsorbente son c_i y q_i.

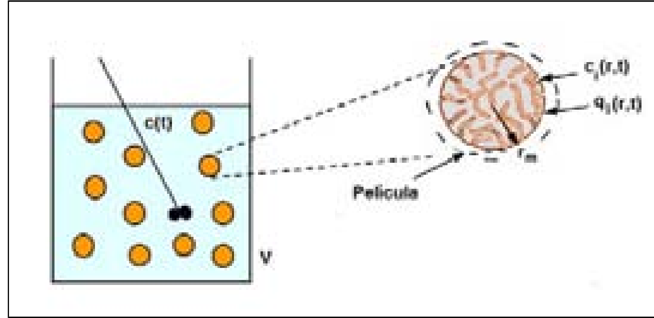


Figura 7.20: Sistema de adsorción por lote.

El balance de masa del soluto en la fase líquida se puede expresar en palabras como:

Velocidad de acumulación = Velocidad de entrada − Velocidad de salida − Velocidad de adsorción

y está dado por:

$$\varepsilon_b V \frac{dc}{dt} = -VR \tag{7.39}$$

el balance de soluto en el adsorbente:

$$V(1-\varepsilon_b)\frac{d\overline{q}}{dt} = VR \tag{7.40}$$

y las condiciones iniciales

$$\text{en } \; t = 0 \qquad c = c_o; \qquad \overline{q} = 0 \tag{7.41}$$

donde $\overline{q}$ es la concentración promedio de soluto en el adsorbente y R es la velocidad de adsorción.

Como se presentó en la sección 7.2, la velocidad de adsorción depende de los mecanismos controlantes de la transferencia de masa. Un rango distintivo de los modelos es la forma que adopta la expresión de R, que depende del o los mecanismos controlantes de la adsorción que sean significativos (película, poro, cinética), del tipo de equilibrio en el sistema y las condiciones de frontera. En los siguientes párrafos se presentan algunos modelos particulares de la teoría cinética para sistema por lotes.

Modelo cinético de tres resistencias En el modelo de tres resistencias, para desarrollar una descripción matemática del proceso de adsorción por lotes, se incorporan tres resistencias a la separación de equilibrio ideal: a) resistencia en la película, b) difusión intrapartícula y c) interacción cinética soluto-ligando.

Se considera que el movimiento de soluto involucra varios pasos: a) su transporte interfacial desde el seno del líquido hasta la superficie del adsorbente a través de una película estancada que rodea al adsorbente caracterizada por un coeficiente de transferencia de masa, k_L, b) la difusión dentro del líquido del poro del adsorbente descrita por un coeficiente, D_i y c) el paso de adsorción del soluto en los sitios activos sobre la superficie del adsorbente. La velocidad de adsorción intrínseca puede ser descrita por diferentes tipos de modelos. En esta sección se utiliza un modelo de adsorción-desorción tipo Langmuir.

Para describir el cambio de concentración de soluto con el tiempo, se puede derivar mediante un balance de soluto en el seno del líquido la ecuación siguiente:

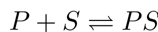
$$\frac{dc}{dt} = -\frac{3}{r_m}\frac{(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b}\ k_L\ (c-c_i)|_{r=r_m} \tag{7.42}$$

La ecuación para describir el cambio de concentración de soluto en el fluido de los poros del adsorbente puede ser obtenida mediante un balance de soluto en la partícula,

$$\varepsilon_i\frac{\partial c_i}{\partial t} + (1-\varepsilon_i)\frac{\partial q_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_i\left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial c_i}{\partial r}\right) \tag{7.43}$$

donde i simboliza el interior del poro del adsorbente.

Generalmente se utilizan modelos simplificados para describir las complejas interacciones entre el soluto y el adsorbente. En estos modelos se utiliza una expresión cinética reversible de segundo orden, donde se supone que el soluto interacciona en forma monovalente con el adsorbente,



$$P + S \rightleftharpoons PS$$

donde P es el soluto en la solución, S es el sitio de adsorción y PS es el complejo soluto-ligando.

La velocidad de adsorción de este tipo de interacción se representa frecuentemente por la expresión de Langmuir,

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 c_i \left(q_{mi} - q_i\right) - k_{-1} q_i \tag{7.44}$$

donde: q_{mi} es la capacidad máxima de adsorción del adsorbente por volumen sólido; k_1 y k_{-1} son las constantes cinéticas de adsorción y desorción, respectivamente.

Al inicio de la operación la concentración de soluto en el seno del líquido es c_o y el sistema se encuentra libre de soluto, por tanto se utilizan las condiciones iniciales siguientes:

$$\text{en } \ t = 0 \qquad c = c_o \tag{7.45}$$

$$\text{en } \ t = 0 \qquad c_i = 0, \quad 0 \leq r \leq r_m \tag{7.46}$$

$$\text{en } \ t = 0 \quad q_i = 0, \quad 0 \leq r \leq r_m \tag{7.47}$$

Debido a la simetría de la partícula, se considera la condición de frontera siguiente:

$$\text{en } \ r = 0 \qquad \left.\frac{\partial c_i}{\partial r}\right|_{r=0} = 0\,, \qquad t > 0 \tag{7.48}$$

Mediante un balance de soluto en la boca de un poro de la partícula, se obtiene una segunda condición de frontera,

$$\text{en } \ r = r_m \qquad k_L \left.\left(c - c_i\right)\right|_{r=r_m} = \varepsilon_i D_i \left.\frac{\partial c_i}{\partial r}\right|_{r=r_m}, \qquad t > 0 \tag{7.49}$$

Este modelo de tres resistencias en serie no tiene una solución analítica, debe ser resuelto por métodos aproximados.

Modelo de parámetros agrupados El modelo de parámetros agrupados (Chase, 1984) utiliza un enfoque empírico sencillo para describir el proceso de adsorción, donde se supone que todos los procesos que limitan la velocidad de adsorción del soluto pueden ser representados por las constantes cinéticas. Este modelo ha sido utilizado para simular la adsorción de proteínas en adsorbentes porosos (Aboudzadeh, *et al.*, 2006; Horstmann,y Chase, 1989). Se supone que las constantes agrupan todas las resistencias del proceso.

En este enfoque la velocidad de transferencia de masa de soluto al adsorbente se describe por una cinética de segundo orden:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c \left(q_m - q\right) - k_{-1} q \tag{7.50}$$

Mediante el balance de soluto se obtiene la línea de operación del sistema:

$$q = \frac{\varepsilon_b V}{(1-\varepsilon_b)V}(c_0 - c) \tag{7.51}$$

Sustituyendo la ecuación anterior y su derivada en la ecuación (7.50) se obtiene:

$$\frac{dc}{dt} = \left[-\frac{(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b}\right]\left\{k_1 c\left[q_m - \frac{\varepsilon_b(c_0-c)}{(1-\varepsilon_b)}\right] - \frac{\varepsilon_b k_{-1}(c_0-c)}{(1-\varepsilon_b)}\right\} \tag{7.52}$$

La solución analítica de la ecuación anterior está dada por:

$$\frac{c}{c_o} = 1 - \left[\frac{(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b c_o}\right]\left\{\frac{(b+a)\left[1-\exp\left(-\frac{2a\,(1-\varepsilon_b)\,(k_1 t)}{\varepsilon_b}\right)\right]}{\left(\frac{b+a}{b-a}\right) - \exp\left(-\frac{2a\,(1-\varepsilon_b)\,(k_1 t)}{\varepsilon_b}\right)}\right\} \tag{7.53}$$

donde:

$$a^2 = b^2 - \left[\frac{c_o\varepsilon_b}{(1-\varepsilon_b)}\right] q_m \tag{7.54}$$

$$b = \frac{1}{2}\left[\frac{c_o\varepsilon_b}{(1-\varepsilon_b)} + q_m + \frac{K_d\varepsilon_b}{(1-\varepsilon_b)}\right] \tag{7.55}$$

Ejemplo 7.5. Adsorción de Inmunoglobulina G (ImG) en proteína A inmovilizada en una matriz de agarosa en un sistema por lotes. Modelo de parámetros agrupados.

El estudio de la cinética de adsorción de ImG en un adsorbente de afinidad con proteína A inmovilizada en una matriz de Sefarosa B, se realizó en una solución amortiguadora al 0.1 M de Tris - HCl a pH = 7 y a 25 °C, en un arreglo experimental como el que se muestra en la Figura 7.21.

Los experimentos de equilibrio mostraron que la isoterma de adsorción del sistema es de tipo Langmuir y está dada por la ecuación:

$$q = \frac{40\ c}{0.019 + c}$$

donde q y c están en mg/mL.

El estudio cinético se realizó colocando en el reactor 25 mL de una solución conteniendo 0.5 mg/L de ImG en buffer de adsorción y agregando en el tiempo cero 0.5 mL de una suspensión 1:1 de adsorbente en buffer. El avance de la adsorción se detectó recirculando rápidamente la solución a través un medidor de UV. Los datos cinéticos obtenidos son los siguientes:

t (min)	0.00	1.95	4.88	6.10	9.76	19.51
c (mg/mL)	0.500	0.443	0.416	0.396	0.368	0.324
t (min)	40.24	80.49	120.00	159.76	200.00	240.24
c (mg/mL)	0.272	0.223	0.199	0.181	0.171	0.165

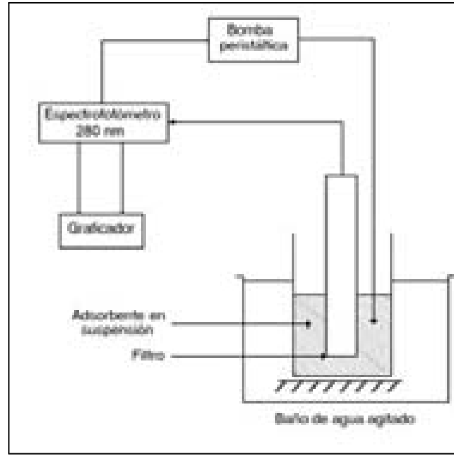


Figura 7.21: Sistema experimental de adsorción intermitente de inmunoglobulina G con agitación.

Se pide: Analizar el ajuste del modelo de parámetros agrupados a los datos experimentales.

Solución:

De acuerdo al arreglo experimental los datos del sistema son los siguientes:

$c_0 =$	0.5 mg/mL
$\varepsilon_b =$	$25.25/25.50 = 0.9902$
$K_d =$	0.019 mg/mL
$q_m =$	40 mg/mL

Para utilizar el modelo de parámetros agrupados dado por la ecuación (7.53) calculamos:

$$b = \frac{1}{2}\left[\frac{0.5 \times 0.9902}{(1-0.9902)} + 40 + \frac{0.019 \times 0.9902}{(1-0.9902)}\right] = 46.21$$

$$a^2 = (46.21)^2 - \left[\frac{0.5 \times 0.9902}{(1-0.9902)}\right] \times 40$$

$$a = 10.74$$

de tal manera que:

$$\frac{c}{c_o} = 1 - \left(1.979\,4 \times 10^{-2}\right)\left\{\frac{(56.95)\left[1-\exp\left(-0.213 k_1 t\right)\right]}{(1.605\,6) - \exp\left(-0.213 k_1 t\right)}\right\}$$

La expresión anterior puede ser evaluada en el intervalo de $0 \leq t \leq 240$ min utilizando como parámetro de ajuste k_1(parámetro agrupado). Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 7.22 con $k_1 = 0.001$ mL/mg$-$s.

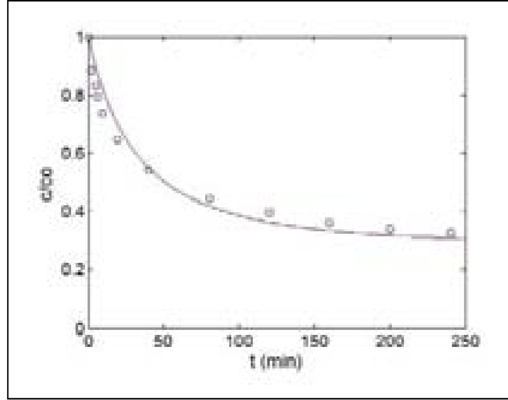


Figura 7.22: Perfil de concentración de ImG del ejemplo 7.5. (o) datos experimentales. (–) ajuste del modelo de parámetros agrupados con $k_1 = 0.001$ mL/mg–s.

Modelo cinético con control de la resistencia en la película: relación de equilibrio tipo Langmuir Cuando la película es la única resistencia a la transferencia de masa en un proceso de adsorción (*e.g.* partículas no porosas) y la relación de equilibrio en el sistema es de tipo Langmuir, el modelo del proceso queda integrado de la siguiente forma:

La transferencia de soluto desde la fase sólida:

$$\frac{dc}{dt} = -\left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right) k_L a(c - c^*) \tag{A}$$

El balance de soluto entre las fases:

$$q = \left(\frac{\varepsilon_b}{1-\varepsilon_b}\right)(c_0 - c) \tag{B}$$

La expresión de equilibrio:

$$q = \frac{q_m c^*}{K_d + c^*} \tag{C}$$

y las condiciones iniciales

$$\text{en} \;\; t = 0 \qquad c = c_0; \qquad q = 0 \tag{D}$$

donde c^*es una concentración hipotética de soluto en el líquido, en equilibrio con la concentración de soluto en el adsorbente.

Las ecuaciones (A-D), pueden ser resueltas utilizando un método de integración numérico, para obtener la variación de la concentración con el tiempo.

Ejemplo 7.6. Adsorción de Inmunoglobulina G (ImG) en proteína A inmovilizada en una matriz de agarosa en un sistema por lotes. Modelo de control en la película.

Para analizar el procesos de adsorción de ImG descrito en el Ejemplo 7.5 utilizando el modelo de la resitencia en la película se tienen los siguientes datos adicionales.

Adsorbente	d_p	90×10^{-6} m
	ρ_p	1028 kg/m^3
Proteína	M_A	150,000 Da
Solución	ρ_L	1000 kg/m^3
	μ_L	9.5×10^{-4} kg/m−s

Se pide: Analizar el ajuste del modelo de resistencia en la película a los datos experimentales.

Solución:

Para calcular el coeficiente de transferencia de masa en el sistema se calcula primero el coeficiente de difusión por medio de la siguiente correlación empírica:

$$D_{AB} = 9.4 \times 10^{-15} \frac{T}{\mu_L (M_A)^{1/3}}$$

donde: D_{AB} es la difusividad molecular [m^2/s], μ_L es la viscosidad de la solución [kg/m − s], T es la temperatura absoluta [°K] y M_A es el peso molecular de la proteína [Da]. De tal manera que:

$$D_{AB} = 9.4 \times 10^{-15} \times \frac{298}{(9.5 \times 10^{-4})\,(150{,}000)^{1/3}} \; \frac{\text{m}^2}{\text{s}} = 5.5 \times 10^{-11} \; \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$$

El coeficiente de transferencia de masa de la película puede ser estimado en este sistema por lotes utilizando la siguiente correlación:

$$k_L = \frac{2D_{AB}}{d_p} + 0.31 \left(\frac{\mu_L}{\rho_p D_{AB}} \right)^{-2/3} \left(\frac{\Delta\rho \mu_L g}{\rho_p^2} \right)^{1/3}$$

donde ρ_p es la densidad del adsorbente, $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre el adsorbente y el líquido y μ_L es la viscosidad del líquido. Entonces,

$$
\begin{aligned}
k_L &= \frac{2 \times \left(5.5 \times 10^{-11}\ \dfrac{\mathrm{m}^2}{\mathrm{s}}\right)}{90 \times 10^{-6}\ \mathrm{m}} + \\
&+ 0.31 \left[\frac{9.5 \times 10^{-4}\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m-s}}}{\left(1028\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m}^3}\right) \times \left(5.5 \times 10^{-11}\ \dfrac{\mathrm{m}^2}{\mathrm{s}}\right)} \right]^{-2/3} \\
&\times \left[\frac{28\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m}^3} \times \left(9.5 \times 10^{-4}\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m-s}}\right) \times 9.8\ \dfrac{\mathrm{m}}{s^2}}{\left(1028\ \dfrac{\mathrm{kg}}{\mathrm{m}^3}\right)^2} \right]^{1/3} \\
k_L &= 4 \times 10^{-6}\ \frac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}}
\end{aligned}
$$

El área específica de la partícula es:

$$
a = \frac{6}{d_p} = \frac{6}{90 \times 10^{-6}\ \mathrm{m}} = 6.67 \times 10^4\ \mathrm{m}^{-1}
$$

En la Figura 7.23 se presenta un programa MATLAB para la solución de las ecuaciones (A-D). Utilizando el valor calculado de $k_L = 4 \times 10^{-6}$ m/s, se obtuvo un perfil muy alejado de los datos experimentales, que sugiere que el fenómeno es más lento que lo que pronostica el modelo (Fig. 7.24a). Utilizando un valor 10 veces menor de $k_L = 4 \times 10^{-7}$ m/s se logró un mejor ajuste, sin embargo la cinética experimental presenta un comportamiento diferente a la pronosticada por el modelo (Fig.7.24b).

Ejemplo 7.7. Adsorción de Inmunoglobulina G (ImG) en proteína A inmovilizada en una matriz de agarosa en un sistema por lotes. Modelo de tres resistencias.

Para analizar el procesos de adsorción de ImG descrito en el Ejemplo 7.5 utilizando el modelo de 3 resistencias se tienen los siguientes datos adicionales.

Adsorbente	$\varepsilon_i =$	0.96
	$\varepsilon_s =$	0.4

donde ε_s es la porosidad de los 0.25 mL de adsorbente utilizado.

En la Figura 7.25 se presenta un programa principal MATLAB para la solución del modelo de tres resistencias, utilizando como parámetro de ajuste D_i. En la Figura 7.26 se presenta la función de integración empleada. La solución requiere además el uso de las funciones dss004.m y dss044.m que pueden ser obtenidas directamente en http://www.scholarpedia.org.

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 7.27 El ajuste del modelo se realizó utilizando $D_i = 6.0 \times 10^{-12}$ m^2/s, el valor calculado de

Programa principal	Función
[illegible]	[illegible]

Figura 7.23: Programa principal y función para la solución del Ejemplo 7.6

$k_L = 4 \times 10^{-6}$ m/s y $k_1 = 1.0$ mL/mg − s. El valor de D_i es típico de la difusión de proteínas en medios cromatográficos (Schroder *et al.*, 2006). El valor de k_1 implica que la velocidad de adsorción intríseca (sobre la superficie del adsorbente) es alta (esta constante no debe ser confundida con la que se utiliza en el modelo de parámetros agrupados). Los resultados del estudio sugieren que las resistencias controlantes en el sistema son dos: la película y la difusión en el poro.

7.4.2. Adsorbedores Tipo Tanque Agitado Continuo

Otro tipo de arreglo utilizado en procesos de adsorción industriales es el adsorbedor tipo tanque agitado con alimentación continua.

Una aplicación particular de este arreglo es en el procesamiento de caldos de fermentación completos (con una filtración gruesa previa en cribas vibradoras), ya que no presenta los problemas de taponamiento con la biomasa como cuando se trata de procesar estos caldos directamente en columnas de lecho fijo.

La operación se efectúa (Fig. 7.28) alimentando al tanque adsorbedor, donde inicialmente se coloca el adsorbente en solvente puro, un flujo F de solución con una concentración de soluto c_0. Durante la operación el adsorbente se mantiene en el interior del tanque y la corriente agotada se retira continuamente del tanque. Una vez que se alcanza cierta concentración de soluto en la corriente

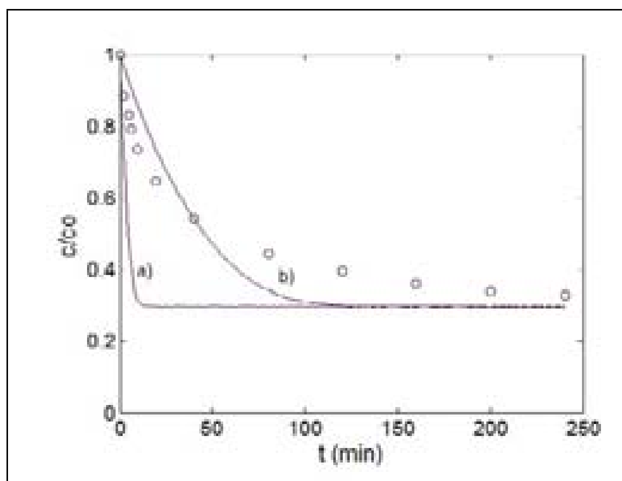


Figura 7.24: Perfil de concentración de ImG del Ejemplo 7.6. (o) datos experimentales. (–) ajuste del modelo de resistencia en la película con: a) $k_L = 4\times10^{-6}$ m/s y b) $k_L = 4 \times 10^{-7}$ m/s.

de salida, se interrumpe la operación y se recupera el soluto concentrado en el adsorbente.

En una primera aproximación para obtener el modelo del proceso, se puede considerar que el tanque está perfectamente agitado, de tal manera que la concentración de soluto a la salida es igual a la concentración de éste en la solución dentro del tanque.

En este sistema la cantidad de soluto adsorbido sobre la superficie del adsorbente varía con el tiempo, lo que se traduce en una operación en estado no estacionario. Por lo tanto, la concentración de soluto en la superficie del adsorbente q y la concentración de soluto en la solución de salida c, son ambas funciones del tiempo de operación. El comportamiento cualitativo del sistema se presenta en la Figura 7.29.

De acuerdo con la figura aún en ausencia de adsorción, la concentración de soluto en la corriente de salida varía con el tiempo. Por otro lado, si la adsorción es muy rápida, la concentración de soluto en la solución será baja por un cierto tiempo, hasta que se alcance la saturación del adsorbente; una vez ocurrido lo anterior la concentración aumentará siguiendo un patrón muy semejante al caso en que no existe adsorción. En el caso general la velocidad de adsorción es intermedia entre los dos casos descritos anteriormente.

Modelos de teoría cinética

Para un adsorbedor continuo tipo tanque agitado el modelo que describe la adsorción, debe integrar la isoterma de adsorción, el balance de masa, la

Figura 7.25: Programa MATLAB para la solución del Ejemplo 7.7.

expresión de la rapidez de la adsorción y las condiciones iniciales.

El balance de masa del soluto en la fase líquida se puede expresar en palabras como:

Velocidad de acumulación = Velocidad de entrada − Velocidad de salida − Velocidad de adsorción

de tal manera que:

$$\varepsilon_b V \frac{dc}{dt} = F(c_0 - c) - VR \tag{7.56}$$

el balance de soluto en el adsorbente:

$$V(1-\varepsilon_b)\frac{d\overline{q}}{dt} = VR \tag{7.57}$$

y las condiciones iniciales

$$\text{en} \;\; t = 0 \qquad c = 0; \qquad \overline{q} = 0 \tag{7.58}$$

donde $\overline{q}$ es la concentración promedio de soluto en el adsorbente, V representa el volumen de la mezcla (solución y adsorbente) en el adsorbedor, c_0 y c son las concentraciones de soluto a la entrada y la salida, respectivamente. La fracción de volumen de líquido (sin incluir el líquido en los poros) al volumen total de la mezcla es ε_b. El flujo de alimentación es F. La velocidad de adsorción de soluto por unidad de volumen de la mezcla de adsorción es R.

```
function   derivadas = lote_lr(t, x, rpar, r)

%*************************************************************************
%....Esta función discretiza las EDP del modelo
%*************************************************************************
%... Parametros, en el vector rpar
      ei = rpar(1); Di = rpar(2); k1 = rpar(3); Kd = rpar(4);
      qm = rpar(5); KL = rpar(6); Rp = rpar(7);V = rpar(8);
      v = rpar(9); r0 = rpar(10); rn = rpar(11); n = rpar(12);

      ci = x(1:n);           % arreglos unidimensionales de ci, qi y c
      qi = x(n+1:2*n);
       c = x(2*n+1);

%... Calcula las derivadas espaciales en dirección r, por medio de las
%... funciones dss004_mi y dss044_mi.
%
%... cir calcula la primera derivada de ci, mediante una aproximación de
%... cinco puntos, centrada:
     cir = dss004_mi(r0,rn,n,ci)';

%... cirr calcula la segunda derivada de ci, mediante una aproximación de
%... cinco puntos, centrada:
%... considerando las condiciones de frontera:
     ur = [0; KL/(Di*ei)*(c-ci(n))];
     cirr = dss044_mi(r0,rn,n,ci,ur,2,2)';

%... Sistema de ecuaciones
     qit = k1*ci.*(qm-qi) - k1*Kd*qi;
     cit = Di*(cirr(2:n-1) + [illegible]) - ...
     (((1-ei)/ei)*qit(2:n-1));
     ct = -(3*v*KL/(Rp*V))*(c-ci(n));

%... Condiciones de frontera
%... res  define un residuo, que tiende a cero cuando se alcanza la
%    convergencia
     res1 = cir(1);
     res2 = cir(n) - KL/(Di*ei)*(c-ci(n));

%... combinando todos los vectores en un vector columna:
     derivadas = [res1; cit; res2; qit; ct];
```

Figura 7.26: Función MATLAB para la solución del Ejemplo 7.7.

Como se presentó en la sección 7.2, la velocidad de adsorción depende de los mecanismos controlantes de la transferencia de masa. De tal manera que la expresión para R depende del sistema particular y debe ser determinada experimentalmente. En este apartado se presentan dos modelos cinéticos utilizados en la adsorción continua en tanque.

Modelo cinético con control de la resistencia en la película: relación de equilibrio lineal El caso más sencillo que permite obtener un modelo mediante integración analítica, es el caso donde la velocidad de adsorción puede ser aproximada mediante un modelo lineal y la isoterma de adsorción es lineal. En este caso la velocidad de transferencia de masa está dada por:

$$R = (1 - \varepsilon_b) k_L a (c - c^*) \tag{7.59}$$

donde k_L es nuevamente el coeficiente de transferencia de masa, a es el área de adsorbente por unidad de volumen de mezcla, c es la concentración de soluto en el seno del líquido, y c^* la concentración hipotética de líquido en equilibrio con la concentración de soluto en el adsorbente.

La isoterma de adsorción lineal se puede expresar como:

$$q = Kc^* \tag{7.60}$$

El modelo se integra con las ecuaciones (7.56-7.60) y su solución es:

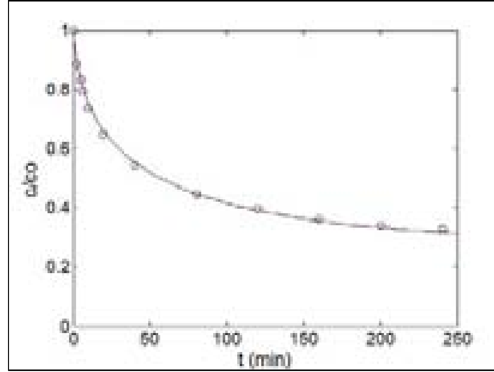


Figura 7.27: Perfil de concentración de ImG del Ejemplo 7.7. (o) datos experimentales. (–) ajuste del modelo de tres resistencias con $k_L = 4 \times 10^{-6}$ m/s, $k_1 = 1.0$ mL/mg−s y $D_i = 6.0 \times 10^{-12}$ m^2/s.

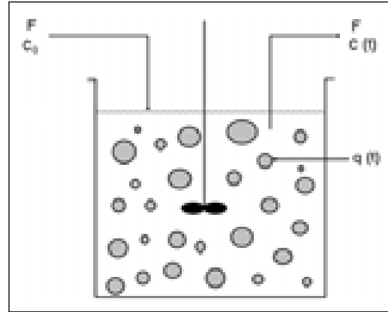


Figura 7.28: Sistema de adsorción tipo tanque agitado continuo.

$$\frac{c_0 - c}{c_0} = \frac{r_2 \; e^{r_1 t}}{(r_2 - r_1)} - \frac{r_1 \; e^{r_2 t}}{(r_2 - r_1)} \tag{7.61}$$

que es la expresión de la variación de la concentración de soluto en la fase líquida con el tiempo de adsorción.

En la expresión anterior:

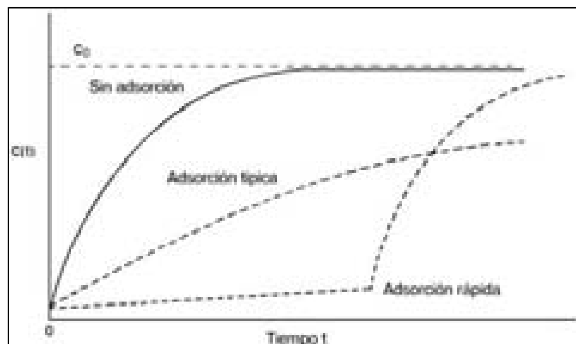


Figura 7.29: Concentración en el líquido de salida de un adsorbedor continuo tipo tanque agitado. Fuente: Belter *et al*, 1988.

$$
\begin{aligned}
r_1 &= \frac{-B+\sqrt{B^2-4AC}}{2A} \\
r_2 &= \frac{-B-\sqrt{B^2-4AC}}{2A} \\
A &= 1 \\
B &= \frac{F}{\varepsilon_b V} + \frac{k_L a(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b}\left(1+\frac{\varepsilon_b}{(1-\varepsilon_b)K}\right) \\
C &= \frac{F k_L a}{\varepsilon_b K V}
\end{aligned}
$$

Ejemplo 7.8. Recuperación de antibióticos por adsorción.

Como alternativa a los procesos tradicionales de recuperación de antibióticos, donde el primer paso consiste en una filtración para la eliminación de micelio y esporas, se desea analizar la posibilidad de una recuperación directa del producto por medio de adsorción iónica en un arreglo tipo tanque agitado continuo.

En un estudio piloto el adsorbente empleado está inicialmente libre de soluto y su constante de equilibrio lineal es 110. La relación de volumen de líquido a volumen total que va a ser empleada es de 0.8. El volumen de reacción es de un litro.

Como primera aproximación se puede considerar que la resistencia controlante es la de la película con un $k_L a = 312$ h^{-1}.

Se pide estimar:

a) El tiempo para lograr el 90 % de recuperación del antibiótico de la corriente de alimentación que fluye a razón de 3 L/h con una concentración de 1.0 mg/L de antibiótico.

b) El tiempo para alcanzar un valor de $c/c_0 = 0.1$

Solución:
a) Las constantes A, B y C están dadas por:

$$
\begin{aligned}
A &= 1.0 \\
B &= \frac{3\ \dfrac{\mathrm{L}}{\mathrm{h}}}{0.8 \times 1.0\ L} + \left[\frac{312\ \mathrm{h}^{-1} \times 0.2}{0.8}\right]\left(1 + \frac{0.8}{0.2 \times 110}\right) = 84.59\ \mathrm{h}^{-1} \\
C &= \frac{312\ \mathrm{h}^{-1} \times 3\ \dfrac{\mathrm{L}}{\mathrm{h}}}{0.8 \times 110 \times 1.0\ \mathrm{L}} = 10.63\ \mathrm{h}^{-2}
\end{aligned}
$$

Las constantes r_1 y r_2 están dadas por:

$$
\begin{aligned}
r_i &= \frac{(-84.59\ \mathrm{h}^{-1}) \pm \sqrt{(84.59\ \mathrm{h}^{-1})^2 - 4(1.0)(10.63\ \mathrm{h}^{-2})}}{2} \\
r_1 &= -0.126\ \mathrm{h}^{-1} \\
r_2 &= -84.46\ \mathrm{h}^{-1}
\end{aligned}
$$

Se puede definir el grado de recuperación mediante la siguiente expresión:

$$
\text{Recuperación} = \frac{\displaystyle\int_0^t F c_0 dt - \int_0^t F c dt - \varepsilon V c}{\displaystyle\int_0^t F c_0 dt} = \frac{\displaystyle\int_0^t dt - \int_0^t \frac{c}{c_0} dt - \frac{\varepsilon V}{F}\frac{c}{c_0}}{\displaystyle\int_0^t dt}
$$

combinando la expresión anterior con la ecuación (7.61),

$$
\begin{aligned}
\text{Recuperación} &= \frac{\displaystyle\int_0^t dt - \int_0^t \left(1 - \frac{r_2 e^{r_1 t}}{r_2 - r_1} + \frac{r_1 e^{r_2 t}}{r_2 - r_1}\right) dt}{\displaystyle\int_0^t dt} \\
&\quad - \frac{\dfrac{\varepsilon V}{F}\left(1 - \dfrac{r_2 e^{r_1 t}}{r_2 - r_1} + \dfrac{r_1 e^{r_2 t}}{r_2 - r_1}\right)}{\displaystyle\int_0^t dt}
\end{aligned}
$$

efectuando la integración,

$$\text{Recuperación} = \frac{t - \left[t - \dfrac{r_2}{r_1(r_2 - r_1)}(e^{r_1 t} - 1) + \dfrac{r_1}{r_2(r_2 - r_1)}(e^{r_2 t} - 1)\right]}{t} - \frac{\dfrac{\varepsilon V}{F}\left(1 - \dfrac{r_2 e^{r_1 t}}{r_2 - r_1} + \dfrac{r_1 e^{r_2 t}}{r_2 - r_1}\right)}{t}$$

sustituyendo valores,

$$0.9 = \frac{7.95(1 - e^{-0.126t}) + 1.8 \times 10^{-5}(1 - e^{-8.440t})}{t} - \frac{\left(\dfrac{0.8}{3}\right)\left(1 + 1.494\,1 \times 10^{-3} e^{-84.46t} - 1.001\,5 e^{-0.126\,t}\right)}{t}$$

de donde:

$$t = 1.2 \text{ h}$$

b) La expresión de la concentración adimensional a la salida del tanque es:

$$\frac{c}{c_0} = 0.1 = 1 - \frac{-84.46 e^{-0.126t}}{-84.46 + 0.126} + \frac{-0.126 e^{-84.46t}}{-84.46 + 0.126}$$

de tal manera que

$$t = 0.85 \text{ h}$$

La recuperación en este tiempo es del 0.92. Existe un tiempo óptimo para realizar este tipo de operaciones.

Modelo cinético con control de la resistencia en la película: relación de equilibrio tipo Langmuir Cuando la velocidad de adsorción puede ser aproximada mediante un modelo lineal y la isoterma de adsorción es de tipo Langmuir, el modelo de adsorción por lotes continuo se integra por las siguientes expresiones:

El balance de soluto en la fase líquida

$$\varepsilon_b V \frac{dc}{dt} = F(c_0 - c) - VR \tag{7.62}$$

el balance de soluto en el adsorbente:

$$V(1 - \varepsilon_b)\frac{dq}{dt} = VR \tag{7.63}$$

las condiciones iniciales,

$$\text{en } \; t = 0 \qquad c = 0; \qquad q = 0 \tag{7.64}$$

Utilizando la expresión de Langmuir se pueden obtener las siguientes ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas del modelo:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{F(c_0 - c)}{\varepsilon_b V} - \frac{(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b} k_L a \left[c - \frac{K_d \; q}{(q_m - q)} \right] \tag{7.65}$$

$$\frac{dq}{dt} = k_L a \left[c - \frac{K_d \; q}{(q_m - q)} \right] \tag{7.66}$$

Estas ecuaciones pueden ser resueltas utilizando un integrador ODE de MATLAB.

La Figura 7.30 fue obtenida mediante la solución del modelo anterior fijando una concentración a la salida del tanque de $c/c_0 = 0.1$. Puede observarse en esta figura que conforme aumenta el flujo de la alimentación, la recuperación obtenida (mg adsorbidos/mg alimentados) y el grado de utilización del adsorbente (q/q_m) disminuyen. La producción obtenida en el proceso (mg/min) aumenta con el flujo hasta que éste alcanza un valor aproximado de 0.4 mL/min.

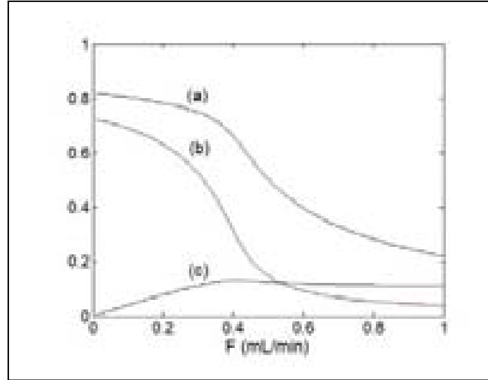


Figura 7.30: Efecto del flujo sobre el comportamiento de un sistema de adsorción tipo tanque continuo con control de la resistencia en la película y relación de equilibrio tipo Langmuir. a) Recuperación de soluto, b) Utilización del adsorbente y c) Producción (masa/tiempo).

7.4.3. Adsorción en Lecho Fijo

La adsorción en lecho fijo es la operación más empleada a escala industrial para la concentración de caldos biológicos. Este tipo de operación se efectúa en columnas empacadas con adsorbentes. Por la parte superior de la columna se alimenta la solución que contiene el soluto de interés. Durante su paso por la columna el soluto es adsorbido en el lecho y la solución agotada es obtenida

a la salida de la columna. Una vez que la concentración de soluto a la salida alcanza una cierta concentración, se interrumpe la operación y se recupera el soluto concentrado. A esta técnica también se le conoce como Cromatografía Frontal.

Curva de ruptura

En la descripción de la adsorción en columna se utilizan gráficas de la variación de la concentración de soluto a la salida de la columna con el tiempo, llamadas curvas de ruptura. La predicción del comportamiento real de la curva de ruptura (análisis frontal), permite diseñar columnas para lograr cierto grado de recuperación, estimar las pérdidas y determinar el tiempo t_R de cada ciclo, así como para estimar dimensiones y arreglos de los equipos para la fase de adsorción. Esta es la información requerida para optimizar la separación (Arnold *et al.*, 1985; Yang y Tsao, 1982). En la Figura 7.31 se presenta un esquema de adsorción en una columna de longitud L (la columna se presenta acostada sólo para efectos explicativos).

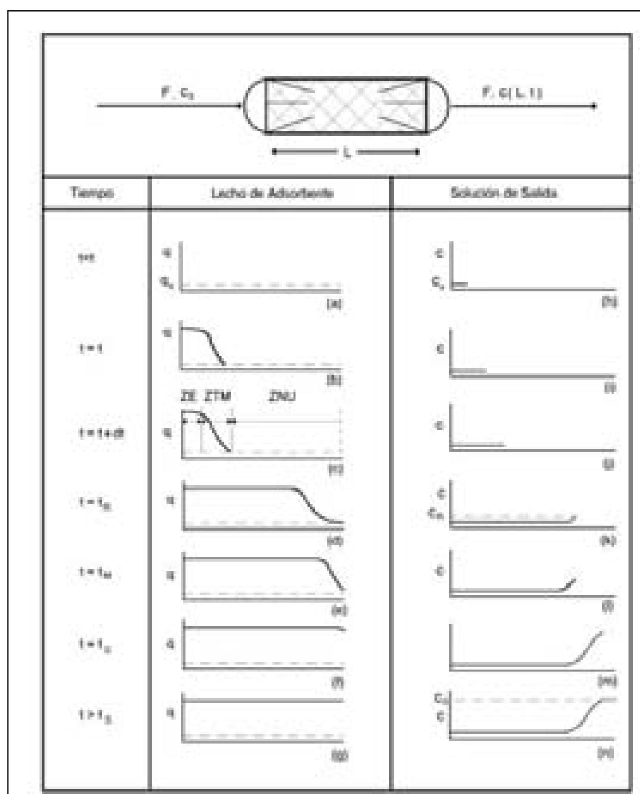


Figura 7.31: Adsorción de soluto y curva de ruptura en columnas.

La parte de la figura llamada “Lecho de Adsorbente” muestra como se va cargando de soluto el adsorbente del lecho conforme transcurre el tiempo. En un tiempo intermedio $(t + dt)$ cuando aún no se agota la columna, se pueden distinguir tres zonas en el lecho de adsorción:

a) La Zona de Equilibrio (ZE) donde el adsorbente se encuentra en equilibrio con la concentración de soluto c_0 de la solución de entrada. En esta zona la concentración de soluto en el adsorbente es constante e igual a $q = f(c_0)$, donde la funcionalidad f depende del tipo de equilibrio.

b) La Zona de Transferencia de Masa (ZTM) donde la concentración de soluto en el adsorbente varía a lo largo de la zona.

c) La Zona No Utilizada (ZNU) donde no se ha presentado adsorción, de tal manera que la concentración de soluto en el adsorbente es igual a la que tenía inicialmente q_x.

Conforme transcurre la adsorción la ZE va ocupando toda la columna, la ZTM se acerca a la salida de la columna y la ZNU tiende a desaparecer.

En la misma Figura 7.31 la parte “Solución de Salida” muestra como varía la concentración de soluto en la solución a la salida de la columna $c(L, t)$ conforme transcurre el tiempo de adsorción. Se pueden distinguir tres eventos importantes en esta parte de la figura:

a) Para tiempos menores a t_R cuando la Zona de Transferencia de Masa aún no llega a la salida de la columna, la concentración de soluto en la solución a la salida de la columna $c(L, t)$, es muy baja e igual a la mínima detectada por el adsorbente c_x (para fines prácticos esta concentración puede tomarse como cero).

b) En el tiempo de ruptura t_R la Zona de Transferencia de Masa ha alcanzado la salida de la columna, de tal manera que se ha incrementado la concentración de soluto en la solución de salida alcanzando el valor de diseño c_R. Este valor es la máxima concentración de soluto permitida en la solución de salida y representa las pérdidas de soluto tolerables en el proceso. El tiempo t_R marca la terminación del ciclo de adsorción.

c) En caso de continuar la operación la concentración de soluto en la solución de salida seguirá incrementándose hasta igualar la concentración de soluto c_0 de la entrada.

La curva que describe la concentración de soluto en la solución de salida en el tiempo, $c(L, t)$ *vs* t, se llama Curva de Ruptura. La forma particular que toma la curva de ruptura depende tanto del tipo de equilibrio del sistema que se trate, como de los mecanismos de transporte involucrados.

Ejemplo 7.9. Adsorción en una columna ideal.

Una columna se alimenta con un flujo de 10 L/min de una solución que contiene 6.0 g/L de estreptomicina. La columna está empacada con $10,000$ g de una resina catiónica cuya adsorción máxima es de $q_m = 1.56$ g/g (Payne, 1989).

Se pide: Calcular la duración del ciclo de adsorción, suponiendo que en el rompimiento toda la columna está en equilibrio con la solución de entrada alcanzando su capacidad de adsorción máxima q_m.

Solución:

El balance de masa global en la columna es:

$$F c_0 \Delta t \ = \ q_m S$$

despejando Δt y sustituyendo valores se tiene:

$$\Delta t = \frac{q_m \ S}{F \ c_0} = \frac{1.56 \ \frac{\text{g}}{\text{g}} \times 10,000 \text{ g}}{10 \ \frac{\text{L}}{\text{min}} \times 6.0 \ \frac{\text{g}}{\text{L}} \times \frac{60 \text{ min}}{\text{h}}} = 4.3 \text{ h}$$

En la Figura 7.32 se presenta un esquema de la columna y de la curva de ruptura para este ejemplo.

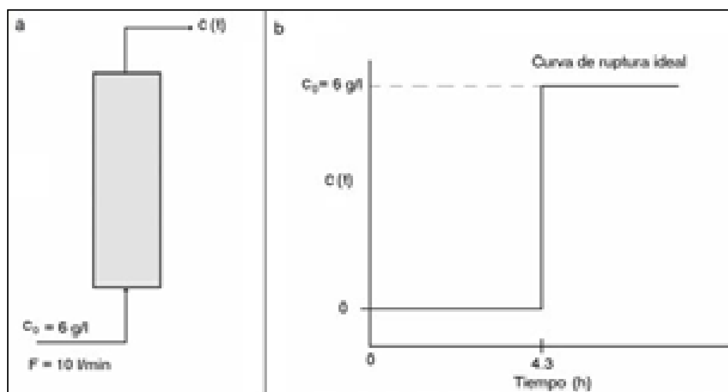


Figura 7.32: Ejemplo 7.9. a) Columna y b) Curva de ruptura.

Ejemplo 7.10. Adsorción de lisina.

Se desea producir 8,000 ton/año de lisina a partir de un caldo que contiene 20 g/L de este aminoácido, utilizando una operación de adsorción por intercambio iónico en columna. Los datos de equilibrio muestran que $q_m = 110$ g/L.

Se pide:

Estimar las dimensiones volumétricas de un sistema de 3 adsorbedores en carrusel, en el cual cada lecho es lavado y eluído una vez que está completamente agotado. Se estima que el ciclo tiene una duración de 4.0 h (adsorción, lavado y elución).

Solución:

a) Cálculo del flujo total a procesar (3 turnos 310 días laborables).

$$F \ = \ \frac{\text{Producción}}{c_0}$$

$$F \ = \ \frac{8 \times 10^9 \ \frac{\text{g}}{\text{año}} \times \frac{\text{año}}{310 \text{ día}} \times \frac{\text{día}}{24 \text{ h}}}{20 \ \frac{\text{g}}{\text{L}}} = 5.37 \times 10^4 \ \frac{\text{L}}{\text{h}}$$

b) Cálculo de la cantidad de resina necesaria en proceso.

$$S = \frac{Fc_0}{q_m} = \frac{5.37 \times 10^4 \ \dfrac{\text{L}}{\text{h}} \times \ 20 \ \dfrac{\text{g}}{\text{L}}}{110 \ \dfrac{\text{g}}{\text{L}}} = 9,763 \quad \frac{\text{L de resina}}{\text{h}}$$

c) Cálculo del volumen del adsorbedor.

$$V = St = 9,763 \ \frac{\text{L}}{\text{h}} \times 4 \text{ h} = 39,000 \text{ L}$$

Se requieren 3 adsorbedores de 39 m^3 cada uno.

Métodos de análisis de columnas de adsorción

Actualmente existe una gran diversidad de modelos para describir la adsorción en columnas empacadas debido a los diferentes mecanismos que pueden controlar la velocidad de transferencia de masa entre las fases (película, poro, resistencias combinadas, etc.) y a la forma de la curva de equilibrio (lineal, Langmuir, etc.) que también introduce variabilidad al modelo. Además, el modelo puede o no considerar los efectos de flujo no ideal contemplados en la dispersión axial (Tabla 7.2).

Tabla 7.2: Algunos factores a considerar en un modelo cinético de adsorción.

Tipo de Equilibrio	Resistencia Controlante	Efecto Mezclado
Lineal	Poro	Flujo ideal tipo tapón
Favorable	Superficie	Flujo tapón con dispersión axial
Desfavorable	Película	
Irreversible	Combinadas	

Entre los principales métodos para predecir la forma de la curva de ruptura de un sistema de adsorción se encuentran:

a) Los métodos aproximados.
b) La teoría de platos.
c) La teoría cinética.
  i) Modelo de equilibrio
  ii) Modelo de tres resistencias
  iii) Análisis adimensional: prámetros agrupados y patrón constante.
  iv) Modelo de fuerza impulsora y equilibrio lineal
  v) Modelo a contracorriente.
d) Teoría platos-cinética

Los dos primeros métodos no están basados en la obtención de modelos a partir de relaciones de equilibrio y balances de masa. Esta variedad de métodos se debe principalmente a que las expresiones matemáticas de las curvas de ruptura son difíciles de manejar en algunos casos.

Análisis aproximado

El método de análisis aproximado es especialmente útil cuando las isotermas del sistema son favorables. Bajo estas condiciones, se supone que la adsorción se desarrolla formándose una zona de transferencia de masa dentro de la columna con un perfil de concentración constante que viaja a lo largo de la columna (Fig. 7.33).

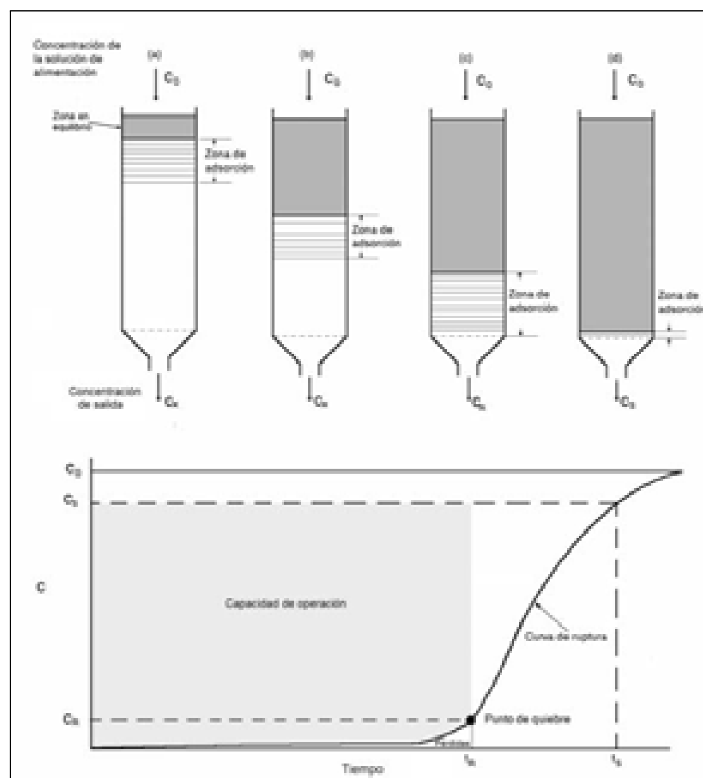


Figura 7.33: Adsorción con patrón constante.

Para caracterizar la curva de ruptura se seleccionan dos concentraciones. La concentración c_R de ruptura que es la máxima concentración que se puede tolerar a la salida de la columna y la concentración c_S que corresponde a la concentración a la salida cuando el lecho se considera agotado. Una guía general es considerar:

$$c_R = 0.1c_0 \text{ y } c_S = 0.9c_0$$

donde c_0 es la concentración de soluto en la solución a la entrada.

Si se supone que la zona de transferencia de masa (ZTM) se mueve a lo largo del lecho con una velocidad constante ϑ, en el tiempo t_R existe una zona en la

parte superior de la columna donde el adsorbente está en equilibrio y una en el fondo donde se localiza la ZTM.

El tiempo que tarda en salir la ZTM de la columna es $\Delta t = t_S - t_R$. Por lo tanto se puede establecer que la longitud de la columna que está en equilibrio Z_e en el tiempo t_R es:

$$Z_e = \vartheta t_R - \vartheta \Delta t \tag{7.67}$$

donde

$$\vartheta = \frac{L}{t_R}$$

y L la longitud de la columna.

Combinando las expresiones anteriores se obtiene:

$$Z_e = L\left(1 - \frac{\Delta t}{t_R}\right) \tag{7.68}$$

La longitud de la ZTM, Z_A, está dada por:

$$Z_A = L\ \frac{\Delta t}{t_R} \tag{7.69}$$

Se pueden utilizar estas relaciones para estimar la fracción de lecho que está utilizado cuando termina la operación o sea en el tiempo t_R, considerando simétrica la curva de ruptura, de tal manera que:

En la zona de saturación:

$$q = f(c_0)$$

y en la ZTM:

$$q = \frac{1}{2} f(c_0)$$

donde la funcionalidad dependerá del tipo de isoterma.

Con base a lo anterior la fracción de lecho utilizado θ está dada por:

$$\theta = \frac{f(c_0)\ L\ \left(1 - \frac{\Delta t}{t_R}\right) + \left[\frac{1}{2} f(c_0)\right]\left(L\ \frac{\Delta t}{t_R}\right)}{f(c_0)\ L}$$

$$\theta = 1 - \left(\frac{\Delta t}{2\ t_R}\right) \tag{7.70}$$

La fracción de lecho utilizado dada por la ecuación (7.70) debe ser obtenida experimentalmente y puede ser utilizada para escalamiento. En este proceso, la longitud de la columna y la velocidad de alimentación deben permanecer iguales en ambas escalas para mantener el mismo patrón de adsorción. Esto conduce al diseño de columnas poco esbeltas con poca caída de presión en las cuales debe asegurarse una distribución uniforme del líquido.

Teoría de platos

Cuando se utiliza la teoría de platos el modelo conceptual de la columna consiste en una serie de etapas en equilibrio (Fig. 7.34). En cada etapa la cantidad de adsorbente está fija y el líquido fluye a través de todas las etapas transportando al soluto. El empleo de esta teoría permite diseñar columnas en forma muy sencilla.

Una limitación del empleo de la teoría de platos es que sólo puede ser utilizada para sistemas con isotermas lineales. Además, en su forma original esta teoría es de uso limitado por su incapacidad de predecir el número de etapas o la altura real de cada etapa y el efecto del cambio de las condiciones de operación sobre el comportamiento de la columna.

Considerando el arreglo que se muestra en la Figura 7.34, el balance de masa de soluto en la fase líquida en la etapa n, puede expresarse en palabras como:

Velocidad de acumulación = Velocidad de entrada – Velocidad de salida – Velocidad de adsorción

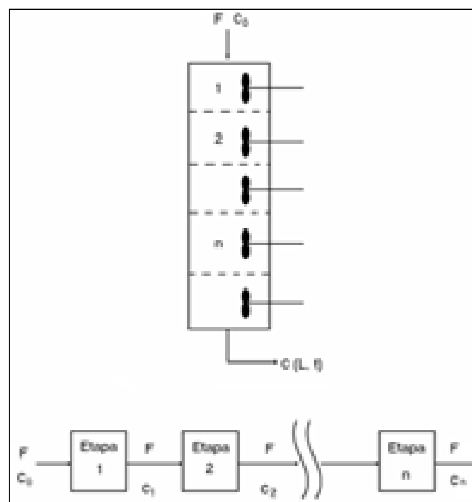


Figura 7.34: Representación de una columna de adsorción acuerdo a la teoría de platos.

La ecuación del modelo es:

$$\varepsilon V \frac{dc_n}{dt} = Fc_{n-1} - Fc_n - (1-\varepsilon) V \frac{dq_n}{dt} \tag{7.71}$$

donde:

n: Número de etapa.

V: Volumen de la etapa (vol. del líquido + vol. adsorbente).

ε: Volumen de líquido por volumen de etapa.

F: Flujo de alimentación (constante entre etapas para soluciones diluidas).

c_n: Concentración de soluto en la solución en la etapa n (masa de soluto por volumen de solvente).

q_n: Concentración de soluto en el adsorbente en la etapa n (masa de soluto por volumen de adsorbente).

El modelo supone que cada etapa está en equilibrio de tal manera que para isotermas lineales:

$$q_n = Kc_n \tag{7.72}$$

combinando las ecuaciones (7.71) y (7.72) se obtiene:

$$\{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]\,V\}\,\frac{dc_n}{dt} = F(c_{n-1} - c_n) \tag{7.73}$$

donde el término entre corchetes de la izquierda de la expresión anterior representa un volumen hipotético.

$$V^* = [\varepsilon + (1-\varepsilon)K]V$$

La ecuación (7.73) puede ser resuelta con las siguientes condiciones:

$$\text{Para} \quad t = 0, \quad c_n = 0 \quad \text{para} \quad n = 1, 2, 3, 4, \ldots\ N$$

$$\text{Para todo} \quad t = t, \quad c(\text{alimentación}) = c_0 \tag{7.74}$$

La solución del anterior sistema de ecuaciones se facilita definiendo un tiempo adimensional mediante la siguiente expresión:

$$\tau = \frac{Ft}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]\,V}$$

o bien en términos del volumen de lecho $V_c = NV$,

$$\tau = \frac{NFt}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]V_c}$$

donde N es el número de etapas.

La ecuación (7.73) queda expresada como:

$$\frac{dc_n}{d\tau} = c_{n-1} - c_n \tag{7.75}$$

La solución de la ecuación (7.75) está dada por:

$$c_n = c_0 \left[1 - e^{-\tau} \left(\sum_{k=0}^{n-1} \frac{\tau^k}{k!} \right) \right] \tag{7.76}$$

La ecuación anterior puede ser expresada de forma más compacta manejando su forma diferencial:

$$\frac{dc_n}{d\tau} = \frac{c_0 \tau^{n-1} e^{-\tau}}{(n-1)!} \tag{7.77}$$

que representa una distribución de Poisson. Puede observarse en la Figura 7.35a que conforme se incrementa el número de etapas, la distribución de Poisson se aproxima a una distribución normal, entonces se puede efectuar la siguiente aproximación:

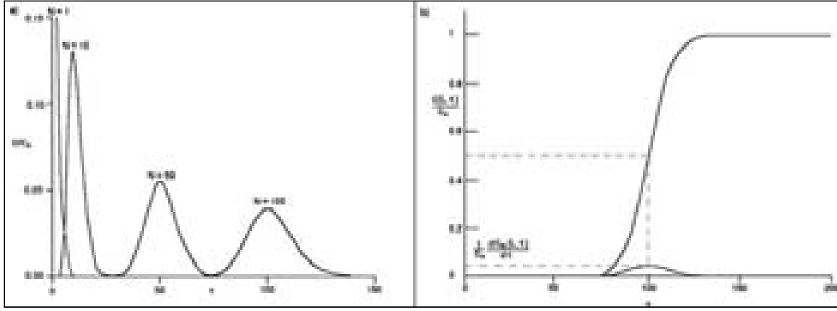


Figura 7.35: Teoría de platos. a) Aproximación de la distribución de Poisson a la distribución Normal y b) Curva de ruptura por teoría de platos con N = 100.

$$\frac{dc_n}{d\tau} \doteq \frac{c_0}{(2\pi)^{\frac{1}{2}} \sigma_A} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{\tau - \tau_o}{\sigma_A} \right)^2 \right] \tag{7.78}$$

De acuerdo a la definición de media y desviación estándar, con ayuda de la ecuación (7.77) se puede encontrar que la ecuación (7.78) tiene una media $\tau_o = N$ y una desviación estándar $\sigma_A = \sqrt{N}$ cuando $n = N$ (a la salida de la columna).

La forma integrada de la ecuación (7.78) para el caso de $n = N$, conduce a una expresión de la siguiente forma:

$$\frac{c(L,\tau)}{c_0} = \frac{1}{2}[1 + Erf(\eta)] \tag{7.79}$$

donde:

$$\eta = \frac{\tau - \tau_o}{2^{\frac{1}{2}} \sigma_A}$$

y Erf es la función error dada por:

$$Erf(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-\eta^2} d\eta$$

En la Figura 7.35b se presenta la curva de $c(L, \tau)$ vs τ para el caso de $N = 100$. En la misma figura se presenta la curva para la derivada de la función:

$$\frac{1}{c_0} \frac{dc(L, \tau)}{d\tau}$$

La ecuación (7.79) puede ser expresada en función del tiempo real utilizando la definición de τ para obtener:

$$\frac{c(L, t)}{c_0} = \frac{1}{2} \left[1 + Erf \left(\frac{t - t_o}{\frac{2^{\frac{1}{2}} t_o}{\sqrt{N}}} \right) \right] \tag{7.80}$$

La ecuación (7.80) describe la curva de ruptura que predice la teoría de platos. Esta permite caracterizar columnas mediante el ajuste de datos experimentales y la determinación de los parámetros hipotéticos N y $HETP$ dados por la ecuación:

$$HETP = \frac{L}{N} \tag{7.81}$$

donde $HETP$ es la altura equivalente de un plato teórico (de sus siglas en inglés).

La teoría de platos no permite predecir la forma de la curva de ruptura cuando cambian las condiciones de operación. Sin embargo, con este propósito suelen combinarse frecuentemente los resultados de la teoría de platos con los de la teoría cinética que se presenta en la siguiente sección.

Teoría cinética

Los modelos de columnas de adsorción que se enmarcan dentro de la teoría cinética se desarrollan mediante la combinación de balances de masa, relaciones de equilibrio, relaciones de transferencia de masa entre las fases y las condiciones iniciales y de frontera del sistema.

El modelo físico de la teoría cinética consiste en la adsorción isotérmica de un soluto que fluye a través de un lecho fijo empacado con partículas difusivas de radio promedio, r_m, y porosidad, ε_i (Fig. 7.36a). La concentración de soluto en la solución a la entrada de la columna es, c_o, la concentración transiente de soluto en el sistema es, $c(z, t)$, y fluye con una velocidad intersticial, v, a través de la columna de altura, L, y una porosidad de lecho, ε. Las concentraciones

de soluto en las fases líquida y sólida del adsorbente son, $c_i(r, z, t)$ y $q_i(r, z, t)$, respectivamente. La dispersión del flujo en la columna se caracteriza por el coeficiente de dispersión axial, D_{ax}.

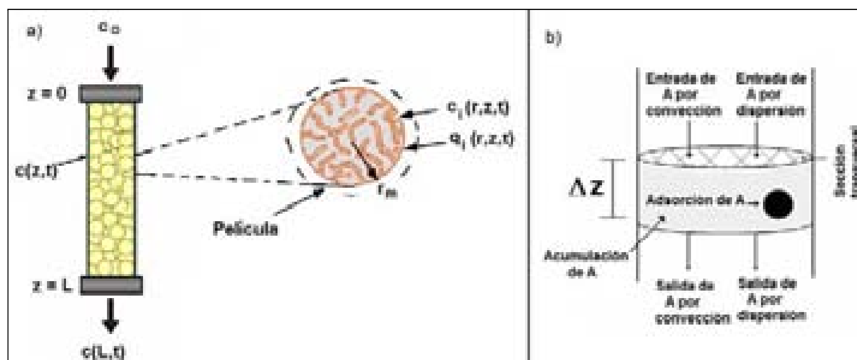


Figura 7.36: Adsorción de lecho fijo. a) Diagrama conceptual de la columna y b) Componentes del balance de soluto en un elemento de volumen de la columna.

Considerando una sección de una columna como la que se muestra en la Figura 7.36b, el balance de soluto en la fase líquida en un elemento de volumen puede ser expresado en palabras como:

$$\begin{aligned} \text{Acumulación} \quad = \quad & \text{Entrada por convección} - \text{Salida por convección} \\ & + \text{Entrada por dispersión} - \text{Salida por dispersión} \\ & - \text{Velocidad de adsorción} \end{aligned}$$

En un sistema isotérmico y despreciando los efectos radiales este balance puede ser escrito como:

$$\begin{aligned} \frac{\varepsilon \Delta V c|_{t+\Delta t} - \varepsilon \Delta V c|_t}{\Delta t} \quad = \quad & F c|_z - F c|_{z+\Delta z} \\ & + \left(-D_{ax}\frac{\partial c}{\partial z}\right) A|_z - \left(-D_{ax}\frac{\partial c}{\partial z} A\right)|_{z+\Delta z} \\ & - R\Delta V \end{aligned}$$

dividiendo entre $\Delta V = A\Delta z$ y tomando límites, se obtiene la ecuación diferencial que describe el balance de soluto en una columna:

$$\frac{\partial c}{\partial t} - D_{ax}\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + \upsilon\frac{\partial c}{\partial z} = -\frac{R}{\varepsilon} \tag{7.82}$$

donde R es la velocidad de transferencia de masa entre las fases por unidad de volumen de lecho (adsorbente y líquido).

La diversidad de modelos de la teoría cinética se derivan de la forma particular que adopta la ecuación anterior. Algunos modelos no consideran la acumulación en el líquido o la dispersión en la columna (modelos no dispersivos). Un rango distintivo de los modelos es la forma particular del lado derecho de la ecuación, que depende del o los mecanismos controlantes de la adsorción que sean significativos (película, poro, cinética), del tipo de equilibrio en el sistema y las condiciones de frontera. En los siguientes párrafos se presentan algunos modelos particulares de la teoría cinética.

Modelo de equilibrio La forma cualitativa de la respuesta dinámica de una columna está determinada completamente por las relaciones de equilibrio. La forma de los perfiles de concentración y por lo tanto de las curvas de ruptura puede ser modificada considerablemente por efectos cinéticos, pero éstos siempre son secundarios, en el sentido que no introducen nuevos patrones de comportamiento, sino que sólo modifican el comportamiento pronosticado a partir de consideraciones de equilibrio.

En los modelos de equilibrio todos los efectos cinéticos se desprecian y la forma de la zona de transferencia de masa sólo depende del tipo de equilibrio. Este enfoque ha sido útil para el análisis preliminar de columnas, así como para el análisis del comportamiento de sistemas complejos.

La utilidad del enfoque de los modelos de equilibrio puede ser ilustrada considerando el caso simple de un sistema en el cual el flujo es ideal y se alcanza el equilibrio local. Bajo estas condiciones la ecuación (7.82) se reduce a:

$$\varepsilon \frac{\partial c}{\partial t} = -\varepsilon \upsilon \frac{\partial c}{\partial z} - R \tag{7.83}$$

con,

$$R = (1-\varepsilon)\frac{\partial q}{\partial t} \tag{7.84}$$

Por regla de la cadena:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{dq}{dc}\frac{\partial c}{\partial t}$$

combinando las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$\varepsilon \frac{\partial c}{\partial t} = -\varepsilon \upsilon \frac{\partial c}{\partial z} - (1-\varepsilon)\frac{dq}{dc}\frac{\partial c}{\partial t}$$

$$\left[\varepsilon + (1-\varepsilon)\frac{dq}{dc}\right]\frac{\partial c}{\partial t} = -\varepsilon \upsilon \frac{\partial c}{\partial z}$$

rearreglando,

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \left[\frac{\varepsilon \upsilon}{\varepsilon + (1-\varepsilon)\frac{dq}{dc}}\right]\frac{\partial c}{\partial z} = 0 \tag{7.85}$$

A partir de la ecuación anterior se puede definir $W(c)$ como la velocidad del frente de concentración de una onda.

$$W(c) = -\frac{\partial z}{\partial t} = -\frac{\dfrac{\partial c}{\partial t}}{\dfrac{\partial c}{\partial z}} = \frac{\varepsilon \upsilon}{\varepsilon + (1-\varepsilon)\dfrac{dq}{dc}} \tag{7.86}$$

Cuando la isoterma es lineal el término dq/dc es constante y $W(c)$ es constante. El perfil de concentración es simétrico.

Cuando la isoterma es desfavorable el término dq/dc de la ecuación anterior aumenta al aumentar la concentración y la velocidad de onda disminuye. La zona de transferencia de masa (ZTM) se ensancha conforme avanza la onda a través de la columna, formando el llamado *patrón proporcional*.

Cuando la isoterma es favorable dq/dc disminuye al aumentar la concentración y la velocidad de onda aumenta. La zona de transferencia de masa tiende a desaparecer debido a que se forman perfiles invertidos ilógicos. En tales situaciones la onda debe ser sustituida por el frente de choque.

En el comportamiento llamado de *patrón constante* el efecto de compactación de la onda cuando el equilibrio es favorable, se compensa con los efectos dispersivos y la onda no se altera a lo largo de la columna (Ruthven, 1987).

Modelo de tres resistencias En el modelo cinético de tres resistencias, el transporte del soluto involucra: a) la transferencia interfacial desde el seno del líquido a través de la película estancada que rodea el adsorbente que se caracteriza por el coeficiente de transferencia de masa en la película, k_L, b) la difusión del soluto en el líquido del poro del adsorbente que se describe utilizando el coeficiente de difusión efectiva, D_i, y c) el paso de adsorción del soluto en los sitios activos de la superficie del adsorbente. La velocidad intrínseca de adsorción puede ser descrita por diferentes modelos cinéticos. En esta sección se utiliza un modelo de adsorción desorción tipo Langmuir.

De acuerdo a la teoría cinética el modelo se integra por la combinación de balances de masa, relaciones de equilibrio, relaciones de transferencia de masa entre las fases y las condiciones iniciales y de frontera del sistema.

En este caso el balance de soluto en la columna puede expresarse como:

$$\frac{\partial c}{\partial t} - D_{ax}\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + \upsilon\frac{\partial c}{\partial z} = -\frac{3}{r_m}\frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}\; k_L\; (c - c_i)|_{r=r_m} \tag{7.87}$$

La ecuación para describir el cambio de concentración del soluto en los poros del adsorbente puede ser obtenida mediante un balance de soluto en la partícula,

$$\varepsilon_i \frac{\partial c_i}{\partial t} + (1-\varepsilon_i)\frac{\partial q_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_i \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial c_i}{\partial r}\right) \tag{7.88}$$

Generalmente se utilizan modelos sencillos para describir las complejas interacciones entre el soluto y el adsorbente. En este caso se utiliza el modelo de Langmuir donde la velocidad de adsorción se representa como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 c_i (q_m - q_i) - k_{-1} q_i \tag{7.89}$$

donde q_m es la capacidad de adsorción máxima.

Las ecuaciones del modelo pueden ser resueltas utilizando las siguientes condiciones iniciales y de frontera:

Al inicio de la operación no hay soluto presente en el sistema, de tal manera que las condiciones iniciales del sistema son,

$$\text{en} \quad t = 0 \quad c = 0, \qquad 0 \leq z \leq L \tag{7.90}$$

$$\text{en} \quad t = 0 \quad c_i = 0, \qquad 0 \leq r \leq r_m \tag{7.91}$$

$$\text{en} \quad t = 0 \quad q_i = 0, \qquad 0 \leq r \leq r_m \tag{7.92}$$

Las condiciones frontera que se utilizan para la columna son las de Danckwerts (Danckwerts, 1953) que consideran dispersión a la entrada de la columna y mezclado perfecto a la salida,

$$\text{en} \quad z = 0 \quad \varepsilon v c|_{z=0} - \varepsilon D_{ax} \left.\frac{\partial c}{\partial z}\right|_{z=0} = \varepsilon v c_o \qquad t > 0 \tag{7.93}$$

$$\text{en} \quad z = L \quad \left.\frac{\partial c}{\partial t}\right|_{z=L} = 0, \qquad t > 0 \tag{7.94}$$

Debido a la simetría de la partícula,

$$\text{en} \quad r = 0 \quad \left.\frac{\partial c_i}{\partial r}\right|_{r=0} = 0, \qquad t > 0 \tag{7.95}$$

En la boca del poro de las partículas se cumple que,

$$\text{en} \quad r = r_m \qquad k_L \left(c - c_i\right)|_{r=r_m} = \varepsilon_i D_i \left.\frac{\partial c_i}{\partial r}\right|_{r=r_m}, \quad t > 0 \tag{7.96}$$

El modelo de tres resistencias no tiene solución analítica y tiene que ser resuelto por métodos aproximados (Montesinos *et al.*, 2005).

Análisis adimensional Los modelos matemáticos de los procesos de adsorción frecuentemente no tienen solución analítica. El enfoque de análisis adimensional ha sido utilizado para encontrar soluciones analíticas para los casos donde una sola resistencia controla el proceso de adsorción o bajo la suposición de patrón constante.

En el análisis se utiliza el modelo no dispersivo que considera que la dispersión axial en el sistema es baja comparada con los efectos cinéticos, de tal manera que el balance de soluto en la columna se expresa como:

$$\varepsilon\frac{\partial c}{\partial t}+\varepsilon \upsilon\frac{\partial c}{\partial z}=-(1-\varepsilon)\frac{\partial \overline{q}}{\partial t} \tag{7.97}$$

donde $\overline{q}$ es la concentración promedio de soluto en el adsorbente.

La forma general de la cinética controlante es:

$$\frac{\partial \overline{q}}{\partial t}=f(c,\overline{q}) \tag{7.98}$$

Las condiciones iniciales y de frontera son:

$$\text{en}\ \ t=0 \quad \overline{q}=0 \tag{7.99}$$

$$\text{en}\ \ z=0 \quad c=c_o \tag{7.100}$$

Efectuando el cambio de variable $t^*=t-z/\upsilon$, el balance en la columna se expresa como (Arnold *et al.,* 1985):

$$\varepsilon \upsilon\frac{\partial c}{\partial z}=-(1-\varepsilon)\frac{\partial \overline{q}}{\partial t^*} \tag{7.101}$$

Las soluciones particulares de este sistema de ecuaciones se obtienen adimensionalizando el modelo anterior utilizando los siguientes grupos adimensionales de las concentraciones:

$$X=\frac{c}{c_o}; \qquad\qquad Y=\frac{\overline{q}}{q_o} \tag{7.102}$$

donde q_o es la concentración correspondiente al equilibrio con c_o. En el caso de equilibrio tipo Langmuir $q_o=(q_m c_o)/(K_d+c_o)$.

Otro grupo adimensional es el volumen procesado adimensional, T,

$$T=\frac{\varepsilon K_d \Upsilon(\tau-1)}{(1-\varepsilon)q_m} \tag{7.103}$$

donde Υ es el factor de separación y τ es el tiempo adimensional dados por:

$$\Upsilon=1+\frac{c_o}{K_d}; \qquad \tau=\frac{\upsilon t}{L} \tag{7.104}$$

En el análisis se define un número de unidades de transferencia N (también conocido como NTU), como el cociente del coeficiente de transferencia de masa y el tiempo de residencia. Este número que caracteriza la forma y empinación de la zona de transferencia de masa y está dado por:

$$N=\frac{\kappa L}{\varepsilon \upsilon} \tag{7.105}$$

donde κ es un coeficiente de transferencia de masa, una constante de adsorción o simplemente una constante cinética agrupada.

La expresión específica de N cuando controla la cinética, la película o el poro es:

$$N_k = \frac{(1-\varepsilon)q_m k_1 L}{\varepsilon \upsilon} \tag{7.106}$$

$$N_L = \frac{(1-\varepsilon)k_L a L}{\varepsilon \upsilon} \tag{7.107}$$

$$N_p = \frac{15(1-\varepsilon)\varepsilon_i D_i L}{r_m^2\, \varepsilon \upsilon} \tag{7.108}$$

Conforme se aumenta la longitud de la columna o se disminuye la velocidad aumenta el número de unidades de transferencia N, produciéndose una curva de ruptura más empinada y una mayor capacidad de operación de la columna. El efecto es más pronunciado con isotermas favorables. En la práctica, se tiene que buscar un óptimo entre la capacidad dinámica alcanzada en una operación y el rendimiento espacio-tiempo del proceso (Gebauer *et al.*, 1997).

No existe una solución analítica general del modelo no dispersivo. Las soluciones particulares que han sido obtenidas describen la concentración de salida de la columna en función de los números adimensionales en la forma:

$$X = f\left(T, N, \Upsilon\right) \tag{7.109}$$

Cuando la expresión del mecanismo limitante adopta la forma de una fuerza impulsora lineal para la difusión en el poro, la cinética de Langmuir o la resistencia en la película, el modelo adimensional toma la siguiente forma (Vermeulen *et al.*, 2007):

$$\left(\frac{\partial Y}{\partial NT}\right)_N = -\left(\frac{\partial X}{\partial N}\right)_{NT} \tag{7.110}$$

Modelo cinético de parámetro agrupados La relación más general que ha sido desarrollada para describir la curva de ruptura considera como el mecanismo limitante de la adsorción una cinética de Langmuir y se conoce como modelo de Thomas (Thomas, 1944). Se supone que todos los procesos que limitan la velocidad de adsorción del soluto pueden ser representados por las constantes cinéticas. En el modelo la expresión cinética está dada por:

$$\frac{\partial \overline{q}}{\partial t} = k_1 c\left(q_m - \overline{q}\right) - k_{-1}\overline{q} \tag{7.111}$$

En este caso particular, se tiene una solución analítica del modelo no dispersivo que se expresa de la siguiente forma:

$$\chi(T,N) = \frac{J\left(\frac{N}{\Upsilon}, NT\right)}{J\left(\frac{N}{\Upsilon}, NT\right) + \left[1 - J\left(N, \frac{NT}{\Upsilon}\right)\right]\exp\left[(1-\frac{1}{\Upsilon})(N - NT)\right]} \tag{7.112}$$

donde J es una función de los parámetros α y β dada por:

$$J(\alpha, \beta) = 1 - e^{-\beta} \int_0^{\alpha} e^{-\xi} I_o(2\sqrt{\beta\xi}) d\xi \tag{7.113}$$

donde I_o es la función Bessel modificada de primer tipo y orden cero (Hiester y Vermeulen, 1952).

Ejemplo 7.11. Adsorción de lisozima en una matriz de Cibacron Blue Sefarosa CL-6B. Modelo de Thomas.

Se realizaron estudios sobre la cinética de adsorción de lisozima en un adsorbente Cibacron Blue Sefarosa CL-6B, en una solución amortiguadora al 0.05M de Tris - HCl a pH = 7.2 y a 25 °C, en un arreglo experimental tipo columna de lecho fijo. (Chase, 1984). Los datos colectados de concentración de soluto a la salida de la columna a diferentes tiempos fueron los siguientes:

t (min)	0.00	50.43	71.86	75.43	86.14	93.28
c (mg/mL)	0.000	0.041	0.095	0.187	0.288	0.383
t (min)	100.43	107.57	114.71	118.28	125.43	161.14
c (mg/mL)	0.500	0.598	0.696	0.810	0.899	0.975

Los valores de las variables de operación y del sistema utilizado se muestran a continuación:

Variable	**Valor**
Conc. de lisozima a la entrada	$c_o = 7.14 \times 10^{-3}$ mol/m^3
Flujo	$F = 1.67 \times 10^{-8}$ m^3/s
Longitud de la columna	$L = 0.014$ m
Diámetro de la columna	$C_D = 0.01$ m
Porosidad del lecho	$\varepsilon = 0.39$
Radio de las partículas	$r_m = 5 \times 10^{-5}$ m
Constante de equilibrio	$K_d = 1.748 \times 10^{-3}$ mol/m^3
Capacidad de adsorción máxima	$q_m = 1.333$ mol/m^3

Se pide: Obtener la curva de ruptura del sistema utilizando el modelo de parámetros agrupados.

Solución:

En la Figura 7.37 se presenta un programa MATLAB para la obtención de la curva de ruptura del sistema experimental utilizando el modelo de Thomas. La Figura 7.38 muestra la curva obtenida empleando $k_1 = 0.286$ m^3/mol−s.

Patrón constante Cuando se alcanza el patrón constante en una columna la concentración de soluto en la fase líquida y en la fase sólida varían proporcionalmente, el balance de masa en la columna se reduce a:

$$\frac{\overline{q}}{c} = \frac{q_o}{c_o} = \left(\frac{q_m}{K_d + c_o} \right) \tag{7.114}$$

Figura 7.37: Programa MATLAB para obtener la curva de ruptura del Ejemplo 7.11.

o en forma adimensional,

$$X = Y \tag{7.115}$$

de esta manera se reduce considerablemente la complejidad del modelo (Helfferich y Carr, 1993). Matemáticamente, la operación de patrón constante asemeja una operación a contracorriente con una línea de operación con pendiente de 45° (Vermeulen *et al.*, 2007).

Cuando una isoterma es favorable, sólo en la región inicial de la columna la ZTM se ensancha conforme avanza, pero a cierta distancia alcanza una forma asintótica como ZTM estable sin cambios adicionales. La forma de la curva de ruptura depende sólo del paso limitante de la adsorción.

Teóricamente es posible alcanzar un patrón constante sólo cuando el equilibrio es favorable, dado que es el único tipo de equilibrio que tiende a compactar la ZTM y compensar los efectos dispersivos de la resistencia a la transferencia de masa. En la práctica, la suposición de patrón constante es generalmente válida para sistemas de equilibrio muy favorables o irreversibles (Yang yTsao, 1982). Cuando el equilibrio es de tipo Langmuir $c > K_d$ y el factor de separación $\Upsilon > 1$.

En equilibrios irreversibles $c >> K_d$ y $\Upsilon \approx \infty$. En este caso la concentración adimensional a la salida de la columna se reduce a:

$$X = f\,(T, N) \tag{7.116}$$

Hall *et al.,* 1996 resolvieron el modelo no dispersivo bajo la suposición de

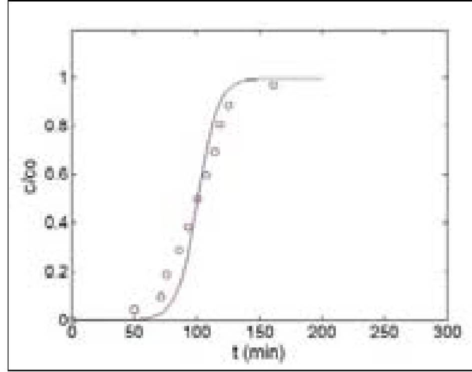


Figura 7.38: Curva de ruptura del Ejemplo 7.11. (o) datos experimentales. (–) ajuste del modelo de Thomas con $k_1 = 0.286$ m^3/mol$-$s.

equilibrio irreversible, reacción muy rápida (equilibrio) y patrón constante. En su modelo se incluyeron las resistencias en la película y el poro. La ecuación de la curva de ruptura obtenida es:

$$N_p\,(T-1) = \frac{N_p}{N_L}\,(\ln\, X + 1) + 2.44 - 3.66\,(1-X)^{\frac{1}{2}} \tag{7.117}$$

Cuando sólo controla la difusión en el poro ($N_p \longrightarrow 0$), la ecuación anterior se simplifica a:

$$X = 1 - \left[\frac{2}{3} - \frac{N_p\,(T-1)}{3.66}\right]^2 \tag{7.118}$$

Cuando la resistencia en la película es la limitante ($N_p \longrightarrow \infty$), (dividiendo la expresión entre N_p) entonces,

$$X = \exp\left[N_L\,(T-1) - 1\right] \tag{7.119}$$

Modelo cinético: Equilibrio lineal y fuerza impulsora lineal en el líquido Este modelo puede ser aplicado cuando se utilizan razonablemente las siguientes suposiciones: a) el proceso es isotérmico, b) la relación de equilibrio es lineal, c) la fuerza impulsora de la adsorción es lineal, d) no existe dispersión en la columna, e) la acumulación de soluto en la fase líquida es despreciable y f) la distribución y el tamaño de las partículas del adsorbente son uniformes.

Con las consideraciones anteriores el sistema de ecuaciones que describe el comportamiento de la columna, en el caso de que el control de la transferencia de masa esté dado por una resistencia lineal, por ejemplo por la película, son las siguientes:

Relación de equilibrio.

$$q = Kc^* \tag{7.120}$$

Balance de soluto en fase líquida.

$$0 = -\varepsilon v \frac{\partial c}{\partial z} - R \tag{7.121}$$

Velocidad de transferencia de masa.

$$R = (1-\varepsilon) k_L a (c - c^*) \tag{7.122}$$

Balance de soluto en el adsorbente.

$$(1-\varepsilon)\frac{\partial q}{\partial t} = R \tag{7.123}$$

Condiciones iniciales y de frontera.

$$t = 0, \quad \forall \ z, \quad q = 0$$

$$t > 0, \quad z = 0, \qquad c = c_0$$

La combinación de las ecuaciones (7.120)-(7.123) conduce a las siguientes dos expresiones:

$$-\varepsilon v \frac{\partial c}{\partial z} = (1-\varepsilon) k_L a \left(c - \frac{q}{K}\right) \tag{7.124}$$

$$(1-\varepsilon)\frac{\partial q}{\partial t} = (1-\varepsilon) k_L a \left(c - \frac{q}{K}\right) \tag{7.125}$$

Estas dos ecuaciones conjuntamente con las condiciones iniciales y de frontera, pueden adimensionalizarse con las siguientes variables:

$$\begin{aligned} N &= \frac{(1-\varepsilon) k_L a L}{\varepsilon v} \\ NT &= \frac{k_L a \left(t - \frac{z}{v}\right)}{K} \\ X &= \frac{c}{c_0} \\ Y &= \frac{q}{K c_0} \end{aligned}$$

obteniéndose el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\frac{\partial X}{\partial N} = -(X - Y) \tag{7.126}$$

$$\frac{\partial Y}{\partial NT} = (X - Y) \tag{7.127}$$

o bien

$$\frac{\partial Y}{\partial NT} = -\frac{\partial X}{\partial N} \tag{7.128}$$

con las condiciones:

$$NT = 0, \quad Y = 0, \ \forall \ \ N$$

$$N = 0, \quad X = 0, \ \forall \ NT$$

Las ecuaciones (7.126) y (7.127) han sido resueltas utilizando transformadas de Laplace (Bird *et al.,* 2002), obteniéndose la siguiente expresión para la curva de ruptura:

$$X = 1 - \int_0^N e^{-(NT+N)} J_o \left[2i\sqrt{(N)\,(NT)} \right] dN \tag{7.129}$$

donde $i = \sqrt{-1}$, y J_o es una función Bessel de primer tipo y orden 0.

En la Figura 7.39 se presenta una solución gráfica de la ecuación (7.129). Esta gráfica puede ser usada para evaluar $k_L a$ a partir de datos de laboratorio o predecir curvas de rompimiento utilizando correlaciones para $k_L a$. Sin embargo, es importante recordar que las consideraciones del modelo deben ser aplicables al caso particular.

Cuando el equilibrio es lineal estos resultados son análogos para cada uno de los casos donde un mecanismo es el controlante, de tal manera que N o el número de unidades de transferencia que se puede utilizar en la ecuación (7.129) es cualquiera de los establecidos en las ecuaciones (7.106)-(7.108), debido a que para un equilibrio lineal $(Y^* - Y) = (X - X^*)$. La curva de ruptura tiene igual forma independientemente del mecanismo controlante (Hall *et al.,* 1966).

Este modelo puede ser utilizado para predecir curvas de ruptura a partir de correlaciones para $k_L a$ y para obtener valores de este coeficiente a partir de datos experimentales de curvas de ruptura utilizando la Figura 7.39.

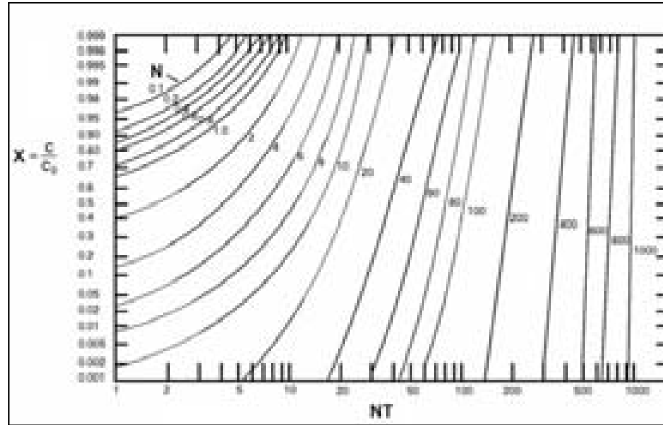


Figura 7.39: Solución gráfica de la ecuación de la curva de ruptura. Modelo cinético: equilibrio lineal, resistencia lineal. Fuente: Vermeulen *et al.*, 1973.

Modelo de adsorción de lecho a contracorriente En una adsorción de lecho fijo la zona de adsorción se mueve hacia abajo de la columna. En el modelo de adsorción de lecho a contracorriente, se supone que el adsorbente se mueve hacia arriba a contracorriente del fluido, de tal manera que la zona de adsorción en la columna permanece estacionaria (Fig. 7.40).

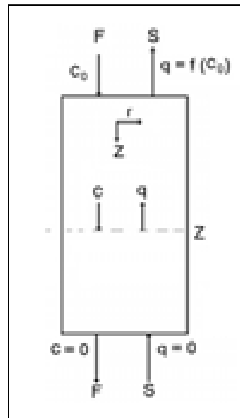


Figura 7.40: Modelo de adsorción de lecho a contracorriente.

El modelo supone que la longitud de la columna es infinita (en lugar de suponer equilibrio lineal), de tal manera que en la parte superior de la columna el adsorbente está en equilibrio con la solución de entrada y en la parte inferior la

solución está libre de soluto. El modelo supone además: a) adsorción isotérmica, b) dispersión despreciable c) volumen líquido en la columna mucho menor que el volumen procesado y d) mecanismo de transferencia de masa lineal.

El balance de soluto entre la salida de la columna y un punto z está dado por:

$$F(c-0) = S(q-0) \tag{7.130}$$

que es la curva de operación del sistema. S es un flujo hipotético de adsorbente.

De acuerdo a la ecuación (7.82) y las suposiciones del modelo, el balance de soluto es un balance de estado estacionario y está dado por:

$$-\varepsilon v \frac{dc}{dz} = (1-\varepsilon)\, k_L a (c - c^*) \tag{7.131}$$

La ecuación anterior puede integrarse para encontrar la longitud necesaria de la columna para lograr un determinado grado de separación, de tal manera que:

$$-\frac{(1-\varepsilon)\, k_L a}{\varepsilon v} \int\limits_0^L dz = \int\limits_{c_0}^{c} \frac{dc}{(c-c^*)}$$

integrando se obtiene:

$$L = \left[\frac{\varepsilon v}{(1-\varepsilon)\, k_L a}\right] \left[\int\limits_{c}^{c_0} \frac{dc}{(c-c^*)}\right] \tag{7.132}$$

o bien,

$$L = [HTU][NTU]$$

donde HTU es la altura de una unidad de transferencia y NTU es el número de unidades de transferencia.

La aplicación de este método requiere una integración numérica de datos de laboratorio para evaluar $k_L a$, con el cual se pueden efectuar estudios de escalamiento.

Combinación teoría de platos - teoría cinética (equilibrio lineal)

La combinación de modelos obtenidos por medio de la teoría de platos con modelos obtenidos por medio de la teoría cinética, permite mantener la estructura sencilla de la teoría de platos y poder correlacionar el efecto de los cambios en las variables de operación sobre la forma de la curva de ruptura, lo cual es útil para establecer las relaciones necesarias para mantener los mismos perfiles de concentración (pérdidas, tiempo de operación, etc.) entre dos escalas de operación de interés.

Una primera aproximación a este enfoque es la combinación de los resultados de la teoría de platos resumidos en la ecuación (7.80), con los resultados de la teoría cinética con un mecanismo lineal controlante y equilibrio lineal, resumidos en la ecuación (7.129), de tal manera que:

$$N \doteq NTU$$

Esta aproximación permite correlacionar la pendiente de la curva de rompimiento con variables de operación, de tal manera que para cada uno de los casos estudiados se tiene lo siguiente:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{\frac{t}{t_o} - 1}{\frac{2^{\frac{1}{2}}}{\sqrt{N}}}\right)\right] \tag{7.133}$$

Cuando el mecanismo controlante de la adsorción está localizado en la película de líquido que rodea a la partícula de adsorbente, de acuerdo a la ecuación (7.107),

$$N \sim \frac{k_L a L}{\upsilon}$$

por ecuación (7.20),

$$k_L \sim \left(\frac{\upsilon}{d_p}\right)^{1/2}$$

por ecuación (7.14),

$$a \sim \frac{1}{d_p}$$

entonces,

$$N \sim \frac{L}{\upsilon^{1/2} d_p^{3/2}}$$

Análogamente, cuando el mecanismo controlante es la difusión del soluto en el seno del adsorbente,

$$N \sim \frac{L}{\upsilon d_p^2}$$

si el mecanismo de control es la difusión del soluto al interior del poro,

$$N \sim \frac{L}{\upsilon d_p^2}$$

en el caso que el mecanismo controlante sea la dispersión,

$$N \sim \frac{L}{d_p}$$

De tal manera que para el modelo combinado lineal se puede generalizar que:

$$N \sim \frac{L}{\upsilon^n d_p^{n+1}} \tag{7.134}$$

Con:
$n = 1/2$ para control de la película.
$n = 1$ para control de la difusión en el sólido.
$n = 1$ para control de la difusión al interior del poro.
$n = 0$ para control de la dispersión.

Ejemplo 7.12. Adsorción de Inmunoglobulina G en proteína A inmovilizada en una matriz de agarosa en una columna empacada.

Se utiliza una columna de 1.0 cm de diámetro empacada con agarosa con proteína A inmovilizada, para adsorber ImG a partir de una solución que contiene 1.71 mg/mL de esta proteína a pH=7.5. El volumen del lecho es de 2.1 mL con una porosidad de 0.35. El equilibrio es tipo Langmuir. Los datos experimentales son los siguientes:

Datos del adsorbente:	$d_p = 90 \times 10^{-6}$ m
	$\varepsilon = 0.35$
	$\rho_p = 1028$ kg/m^3
	$q_m = 43$ mg/mL
	$Kd = 0.019$ mg/mL
	$\varepsilon_i = 0.96$
Datos de la solución:	$\rho_L = 1000$ kg/m^3
	$\mu_L = 9.5 \times 10^{-4}$ kg/m−s
	$F = 0.4$ cm^3/min
	$D_{AB} = 5.5 \times 10^{-11}$ m^2/s

El coeficiente de transferencia de masa puede ser estimado utilizando la siguiente correlación:

$$\frac{k_L d_p}{D_{AB}} = 2 + 1.45 \left(\frac{d_p \nu \rho_L}{\mu_L}\right)^{1/2} \left(\frac{\mu_L}{\rho_L D_{AB}}\right)^{1/3}$$

La curva de ruptura experimental se muestra en la Figura 7.41.

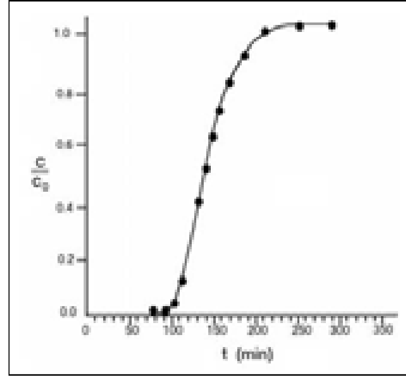


Figura 7.41: Curva de ruptura experimental ImG-Proteína A. Datos de: Hortsman y Chase, 1989.

Se pide:

a) Estimar gráficamente el porcentaje de pérdidas si se deja correr la adsorción hasta que $c/c_0 = 0.1$.

b) Estimar a partir de la curva de ruptura la fracción de lecho ocupado cuando $c/c_0 = 0.1$, suponiendo que el lecho se agota a los 200 min.

c) Comparar los datos experimentales con la predicción del modelo de platos.

d) Comparar los resultados experimentales con la predicción del modelo cinético: equilibrio lineal-resistencia lineal.

e) Comparar los resultados experimentales con los del modelo de lecho continuo.

Solución:

a) Las pérdidas se pueden calcular mediante la siguiente expresión:

$$\text{Pérdidas} = \frac{\int_0^t c\,dt}{\int_0^t c_0\,dt}$$

En forma aproximada la expresión anterior equivale a el área del triángulo bajo la curva de ruptura en el punto de ruptura, la cual de acuerdo a la curva de ruptura experimental es:

$$\text{Pérdidas} = \frac{(0.1-0)(110-90)}{(2)(110)} \times 100 = 0.9\,\%$$

b) La fracción de lecho ocupado de acuerdo a la ecuación (7.70):

$$\theta = 1 - \left(\frac{\Delta t}{2t_R}\right) = 1 - \left[\frac{(t_S - t_R)}{2t_R}\right] = 1 - \left[\frac{(200-110)}{2\times 110}\right] = 0.60$$

c) El Modelo de Platos está dado por la ecuación (7.80):

$$c(L,t) = \frac{c_0}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t - t_o}{2^{\frac{1}{2}}\sigma_A}\right)\right]$$

De la Figura 7.41 se pueden obtener dos pares de datos para calcular σ_A.

$$\text{Para}\quad \frac{c}{c_0} = 0.5 \qquad t_o = 140 \text{ min}$$
$$\text{Para}\quad \frac{c}{c_0} = 0.1 \qquad t_R = 110 \text{ min}$$

Con estos dos puntos sobre la curva de ruptura se puede estimar σ

$$0.1 = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{110 - 140}{2^{\frac{1}{2}}\sigma}\right)\right]$$

de tal manera que:

$$\sigma_A = 23.33 \text{ min}$$

En la Figura 7.42 se muestra la curva de ruptura de acuerdo a este modelo.

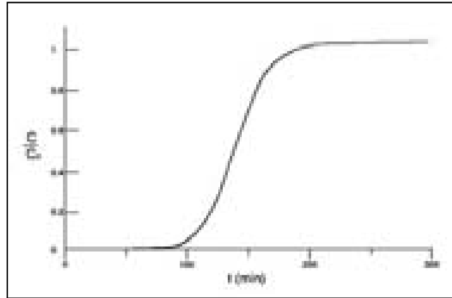


Figura 7.42: Curva de ruptura. Modelo de platos. Ejemplo 7.12 c.

d) Modelo Cinético. La curva de ruptura en este caso está dada por la ecuación (7.129) que puede aproximarse a (Vermeulen *et al.*, 1973):

$$X = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\sqrt{NT} - \sqrt{N}\right)\right]$$

Cálculos:
Área de la sección transversal de la columna:

$$A = \frac{\pi D_c}{4} = \frac{\pi \times 1.0 \text{ cm}^2}{4} = 0.785 \text{ cm}^2$$

Velocidad superficial:

$$\nu = \frac{F}{A} = \frac{0.4 \ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{min}}}{0.785 \text{ cm}^2} = 8.3 \times 10^{-5} \ \frac{\text{m}}{\text{s}}$$

Coeficiente de Transferencia de Masa:
Utilizando la correlación proporcionada se puede calcular k_L.

$$\frac{(k_L)(90 \times 10^{-6} \text{ m})}{5.5 \times 10^{-11} \ \dfrac{\text{m}^2}{\text{s}}} =$$

$$\begin{aligned} &= 2 + 1.45 \left(\frac{90 \times 10^{-6} \ m \times 8.3 \times 10^{-5} \ \dfrac{\text{m}}{\text{s}} \times 1000 \ \dfrac{\text{kg}}{\text{m}^3}}{9.5 \times 10^{-4} \ \dfrac{\text{kg}}{\text{m} - \text{s}}} \right)^{1/2} \\ &\times \left(\frac{9.5 \times 10^{-4} \ \dfrac{\text{kg}}{\text{m} - \text{s}}}{1000 \ \dfrac{\text{kg}}{\text{m}^3} \times 5.5 \times 10^{-11} \ \dfrac{\text{m}^2}{\text{s}}} \right)^{1/3} \\ k_L &= 3 \times 10^{-6} \ \frac{\text{m}}{\text{s}} \end{aligned}$$

Área por volumen de lecho:

$$a = \frac{6}{d_p} = \frac{6}{90 \times 10^{-6} \text{ m}} = 66,666 \text{ m}^{-1}$$

Coeficiente de transferencia de masa volumétrico:

$$k_L a = 3 \times 10^{-6} \ \frac{\text{m}}{\text{s}} \times 66,666 \text{ m}^{-1} = 0.2 \text{ s}^{-1}$$

Variables adimensionales:

$$
\begin{aligned}
N &= \frac{(1-\varepsilon)k_L a L}{\varepsilon v} = \frac{(1-0.35)(0.2\ \mathrm{s}^{-1})(2.67\ \mathrm{cm})}{\left(8.3\times10^{-5}\ \dfrac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}}\right)\left(\dfrac{100\ \mathrm{cm}}{\mathrm{m}}\right)} = 41.8 \\
NT &= \frac{(k_L a)\left(t-\dfrac{L}{v}\right)}{K} = \frac{\left(0.2\ \mathrm{s}^{-1}\right)\left(t-\dfrac{2.67\ \mathrm{cm}\times0.35}{8.3\times10^{-5}\ \dfrac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}}\times\dfrac{100\ \mathrm{cm}}{\mathrm{m}}}\right)}{(25)} \\
NT &= 8\times10^{-3}\,(t-112.6)
\end{aligned}
$$

donde t está dado en segundos.

En la Figura 7.43 se muestran los resultados en forma gráfica. En la Figura 7.43a se observa que el ajuste del modelo a la curva real es muy pobre. Utilizando el mismo modelo con $K = 33$ y $k_L = 1.5\times10^{-5}$ m/s, se produce un ajuste más adecuado (Fig. 7.43b).

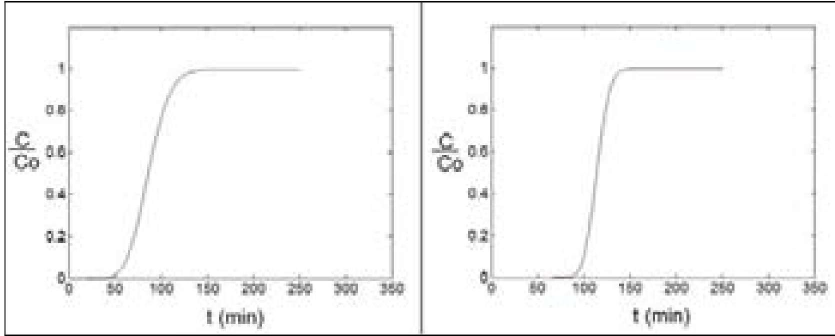


Figura 7.43: Curvas de ruptura. a) Modelo cinético lineal. Ejemplo 7.12d. $K =$ 25 y $k_L = 3\times10^{-6}$ m/s y b) Modelo cinético lineal. Ejemplo 7.12d. $K = 33$ y $k_L = 1.5\times10^{-5}$ m/s.

e) Modelo Contracorriente. De acuerdo a la ecuación (7.32) el empleo de este modelo implica una integración como la que se muestra en la Figura 7.44.

La curva de operación que se muestra en la Figura 7.44a está comprendida entre los puntos $(0,0)$ y $[c_0,\ q(c_0)]$. La curva de equilibrio se obtiene dando valores a c, en el rango de 0 a c_0, en la ecuación de equilibrio. Los valores de c^* se obtienen con valores de q tomados de la curva de operación y sustituidos la ecuación de equilibrio. La tabla siguiente muestra algunos valores de estos cálculos.

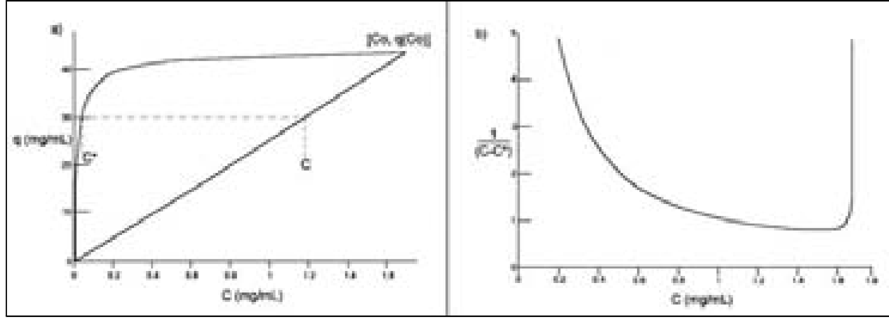


Figura 7.44: Ejemplo 7.12e. Modelo lecho a contracorriente. a) curvas de equilibrio y operación y b) Integración gráfica.

c	q	$c*$	$q*$	$1/(c-c*)$
1.7099	42.5250	1.7009	42.5274	111.7
1.7095	42.5150	1.6657	42.5273	022.8
1.7090	42.5026	1.6236	42.5272	011.7
1.7050	42.4031	1.3498	42.5261	002.8
0.5000	12.4349	0.0077	41.4258	002.0
0.2000	04.9740	0.0025	39.2694	005.1
0.1000	02.4870	0.0012	36.1345	010.1
0.0500	01.2435	0.0006	31.1594	020.2
0.0300	00.7461	0.0003	26.3265	033.7
0.0100	00.2487	0.0001	14.8276	101.1
0.0050	00.1243	0.0001	08.9583	202.2

El área bajo la curva de la Figura 7.44b es de 1.346 y de acuerdo a la ecuación (7.132),

$$L = \left[\frac{\varepsilon v}{(1-\varepsilon)\, k_L a}\right] \left[\int_c^{c_0} \frac{dc}{(c-c^*)}\right]$$

$$k_L a = \left[\frac{\varepsilon v}{(1-\varepsilon)\, L}\right] (1.346)$$

$$k_L a = \left[\frac{8.3 \times 10^{-5}\ \dfrac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}} \times \dfrac{100\ \mathrm{cm}}{\mathrm{m}}}{(1-0.35) \times 2.675\ \mathrm{cm}}\right] (1.346) = 0.0064\ \mathrm{s}^{-1}$$

7.5. Sumario

La operación de adsorción permite procesar soluciones diluidas para concentrar solutos mediante su inmovilización reversible en sólidos especializados llamados adsorbentes. En el estudio de la adsorción son de fundamental importancia cuatro aspectos: los tipos de adsorbentes disponibles, los mecanismos de adsorción de acuerdo al tipo de interacción soluto-adsorbente, las relaciones de equilibrio de los sistemas y la cinética de la adsorción.

La operación de adsorción puede realizarse en forma por lotes o continua en tanques agitados, pero se realiza más frecuentemente en columnas de lecho fijo. La descripción de la dinámica de la adsorción es relativamente compleja y puede ser abordada mediante diferentes enfoques que conducen a diseños que varían desde los puramente empíricos hasta los muy sofisticados.

7.6. Problemas

7.1. Parámetros de equilibrio. La Figura 7.45 muestra los datos de equilibrio del sistema para el sistema albúmina-S Sefarosa FF a pH = 5 y $T = 25$ °C.

Se pide: Calcular las constantes k_d y q_m del sistema.

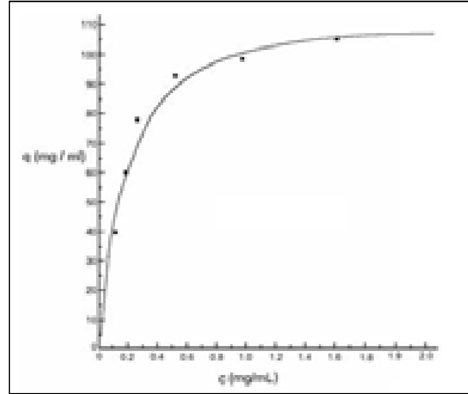


Figura 7.45: Curva de equilibrio para albúmina. Fuente: Skidmore *et al.*, 1990.

7.2. Adsorción por lotes. Un volumen de 2 litros de una solución proteica con una concentración de soluto de 0.5 mg/mL, se mezcla con 50 mL de adsorbente en una operación por lotes y se obtiene un 90 % de recuperación.

Se pide: Estimar la concentración final de soluto en el adsorbente.

7.3. Cálculo de recuperación. Estimar el porcentaje de recuperación del Ejemplo 7.8 si la adsorción se deja a correr 2.0 h.

7.4. Ecuación de diseño. Encontrar la expresión matemática para $q(t)$ en el caso del adsorbedor tipo tanque agitado continuo.

7.5. Curvas de ruptura. Simular el perfil adimensional de un adsorbedor de columna utilizando el modelo de la teoría de platos con $t_o = 30$ min, para los siguientes tres casos: a) $N = 50$, b) $N = 100$ y c) $N = 300$.

7.6. Análisis paramétrico. La curva de ruptura de una columna puede simularse adecuadamente mediante un modelo cinético lineal con $K = 150$, $\varepsilon = 0.35$, $k_L = 10^{-4}$ m/s, $F = 50$ cm^3/min, $A = 0.785$ cm^2 y $L = 10$ cm.

Se pide: Analizar el efecto sobre la curva de ruptura de $\pm$ 20 % de variación en $k_L a$, K y F, considerando los parámetros restantes constantes.

7.7. Equilibrio lineal y fuerza impulsora lineal en el líquido. Obtener la ecuación (7.129). **Pista**: Ver Problema $23D_1$ de Bird *et al.,* 2002).

7.8. Procesamiento integral en tanques. El procesamiento directo de caldos completos para la recuperación de productos extracelulares, se ha estudiado como una alternativa para disminuir las pérdidas asociadas a varios pasos de recuperación, y por lo tanto incrementar la recuperación. Sin embargo, el procesamiento de caldos completos en columnas puede originar problemas de taponamiento de éstas, entonces una alternativa es el uso de adsorbedores continuos tipo tanque. Este sistema ha sido utilizado en la recuperación de novobiocina (Payne, 1989).

Considere un tanque perfectamente agitado en el cual la solución y el adsorbente siempre están en equilibrio lineal con una constante $K = 0.015$ L/g adsorbente. El tiempo de residencia en el tanque $V_L/F = 0.33$ h, la relación de adsorbente a flujo es $S/F = 98$ g$-$h/L y la concentración de la solución a la entrada $c_0 = 2$ g/L.

Se pide: Obtener la variación de la concentración de novobiocina en la salida del tanque.

7.9. Lecho móvil. Se utiliza una columna de intercambio iónico de lecho móvil para separar cefalosporina de un caldo de fermentación que contiene 5 g/L del antibiótico, utilizando una relación de flujos de 10 a 1. La velocidad de flujo de líquido permisible es de 1.5 m/h y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa toma un valor de 12.0 h^{-1}. La relación de equilibrio del sistema es:

$$q = 25c^{1/2}$$

donde q está en g/L de resina mientras que c en g/L de solución.

Se pide: Determinar la altura necesaria de la columna si el objetivo es recuperar el 96 % de cefalosporina.

Resp. $L = 0.6$ m

7.10. Adsorción en columna. Un nuevo antibiótico se va a separar de un caldo de fermentación mediante una operación de adsorción en lecho fijo, utilizando una columna de 5 cm de diámetro y 50 cm de longitud. En esta columna el coeficiente de transferencia de masa volumétrico $[k_La(1-\varepsilon)]$ esperado es de 9 h^{-1}. La alimentación a la columna tiene una concentración de 4.0 g/L y se desea que la corriente de salida contenga solamente 0.1 g/L.

La relación de equilibrio del sistema es:

$$q = 20c^{1/2}$$

y la línea de operación está dada por:

$$q = 5(c - 0.1)$$

Se pide: Estimar el flujo manejable por la columna.

Resp. 150 L/h

7.11. Adsorción en lotes. En la adsorción intermitente de β-galactosidasa la relación de la actividad inicial de la enzima en la solución a la actividad de la enzima en solución a los 10 min es de 2.86; y a los 30 min de 5.755. Para tiempos muy grandes el valor es de 7.39 (Pungor *et al.*, 1987). Considerando el modelo de adsorción por lotes (equilibrio lineal y control de la película) siguiente:

$$\frac{c}{c_0} = P + (1 - P)\exp(-Bt)$$

Se pide: Estimar los parámetros P y B.

Resp. $P = 0.135$ y $B = 0.103$

7.12. Simulación de curva de adsorción. En la adsorción por lotes de albúmina en un adsorbente de Sefarosa la curva de equilibrio se puede aproximar en forma lineal a:

$$q = 65c$$

Los parámetros de la adsorción son:

$k_L = 5 \times 10^{-6}$ m/s
$\varepsilon = 0.99$
$d_p = 105 \times 10^{-6}$ m
$c_0 = 2$ mg/mL

Se pide: Representar gráficamente la variación de la concentración de soluto en la fase líquida con el tiempo de adsorción, suponiendo una sola resistencia controlante y equilibrio lineal.

7.13. Modelo cinético: En una columna de lecho fijo empacada con S Sefarosa se realiza la adsorción de albúmina bajo las siguientes condiciones:

$q = 130c$ (aprox.)
$k_L = 5.6 \times 10^{-6}$ m/s
$\varepsilon = 0.35$
$d_p = 105 \times 10^{-6}$ m
$c_0 = 1$ mg/mL
$D_c = 1$ cm
$L = 2.3$ cm
$F = 1$ cm^3/min

Se pide: Mediante el modelo cinético de resistencia en la película y equilibrio lineal, obtener una representación gráfica de la curva de rompimiento del sistema.

7.14. Patrón constante. En condiciones de adsorción muy favorables (irreversible), la forma de la zona de transferencia de masa de la columna es

independiente del tiempo (patrón constante). Bajo estas condiciones y con el control de la resistencia a la transferencia de masa al interior del poro (modelo adecuado para algunos procesos de afinidad), la curva de ruptura adimensional es única, permite representar varias condiciones de operación, y está dada por (Arnold *et al.,* 1985):

$$X = 1 - \left[\frac{2}{3} - 0.273 N_p \left(T - 1\right)\right]^2$$

Cuando se emplea una columna de Sefarosa 4B-Ácido-Arsanílico para adsorber anticuerpos monoclonales bajo las siguientes condiciones:

$d_p = 0.01$ cm
$\upsilon = 0.011$ cm/s
$L = 16.5$ cm
$\varepsilon = 0.6$
$q_R/c_0 = 18.1$

el modelo se ajusta a los datos experimentales con $N_p = 8$.

Se pide:

a) Graficar la curva de ruptura para el escalamiento del sistema con $q_R/c_0 = 18.1$ y una columna de 15×60 cm , en los siguientes tres casos:

a1) $\upsilon = 0.020$ cm/s, a2) $\upsilon = 0.015$ cm/s y a3) $\upsilon = 0.010$ cm/s.

b) Graficar X vs volumen alimentado $(Ft - \varepsilon V)$ en el rango de 70 a 86 litros, para cada uno de los tres casos anteriores.

c) ¿Que significa el punto de intersección de las tres curvas?

7.15. Obtención de solución modelo columna. Desarrollar un programa para la obtención de la solución gráfica del modelo Equilibrio lineal y fuerza impulsora lineal en el líquido. **Pista**: Se puede utilizar la función *besselj* de MATLAB.

7.16 Cálculo del coeficiente de transferencia de masa a partir de la curva de ruptura. Durante la adsorción de una proteína en un lecho fijo de 10 cm de longitud y 0.34 de porosidad, se alcanza el punto de ruptura $c/c_0 = 0.1$ a las 9.5 horas de operación de la columna a una velocidad superficial de 20 cm/h. La concentración de la solución de entrada es lo suficientemente diluida para suponer un equilibrio lineal dado por la siguiente expresión:

$$q = 40c$$

donde c y q tienen unidades de mg/mL.

Se pide: Calcular el coeficiente de transferencia de masa $k_L a$ utilizando el modelo cinético de equilibrio lineal y fuerza impulsora lineal en el líquido. **Pista**: Obtener expresiones de N y NT en función de $k_L a$ y resolver por prueba y error en la solución gráfica del modelo en el punto (9.5, 0.1) o bien utilizar la ecuación aproximada del Ejemplo 7.12.

Resp. $k_L a = 100\ h^{-1}$

7.17 Selección entre dos tipos de adsorbentes. Se desea seleccionar un adsorbente entre los tipos A y B, para la purificación de ImG que se encuentra a una concentración de 5.0 g/L en un volumen de de 500 L de caldo. La adsorción y elución de la ImG se realiza a diferentes pHs de tal manera que las isotermas de cada una de estas etapas son diferentes. Los datos de los adsorbentes son los siguientes:

	Adsorbente	
Etapa	**Tipo A**	**Tipo B**
Adsorción	$q_m = 0.7$ g/L	$q_m = 0.4$ g/L
	$K_d = 0.001$ g/L	$K_d = 0.0001$ g/L
Elución	$q_m = 0.005$ g/L	$q_m = 0.001$ g/L
	$K_d = 0.001$ g/L	$K_d = 0.05$ g/L

Se pide: Seleccionar un adsorbente y explicar las bases de la selección.

7.18. Compresión de lechos. Se empaca una columna de 6.0 cm de diámetro y 30 cm de altura de lecho con partículas de Sefadex de 80 μm de diámetro. La alimentación que contiene eritropoyetina (EPO) en una solución 0.05M de NaCl se alimenta a la columna a un flujo de 10 mL/min. La columna puede considerarse empacada en forma compacta ("close packed") con una porosidad de 0.27.

Después de la etapa de adsorción la columna se lava con buffer 0.05 M de NaCl y se eluye con una solución 1.0 M de NaCl. Durante la elución las partículas de adsorbente se contraen hasta alcanzar un diámetro de 40 μm y se rearreglan nuevamente en una forma compacta. Las viscosidades de los buffers de adsorción y elución se pueden considerar iguales.

Se pide: Calcular el flujo durante la elución después que las partículas alcanzan una altura de lecho estable, si la caída de presión a través del lecho se mantiene constante.

Resp. 20 mL/min

7.19. Purificación por afinidad. Una columna de afinidad empacada con Sefarosa-Gelatina se utiliza para purificar fibronectina (F) a partir de plasma sanguíneo de perro. El plasma contiene 400 mg/L de F. La isoterma de adsorción del sistema es:

$$q = \frac{c}{0.01 + c} \tag{7.135}$$

donde c tiene unidades de mg/L de solución y q tiene unidades de mg/mL de adsorbente (sin líquido de poro).

El lecho tiene 20 cm de longitud, 3.0 cm de diámetro y una porosidad de 0.2. Las partículas tienen una porosidad de 0.9. El plasma de perro es relativamente barato comparado con el precio de la F y el costo del adsorbente. Debido a esto

en cada corrida se utiliza al máximo la capacidad del lecho. Las resistencias a la transferencia de masa pueden ser despreciadas en el sistema.

Se pide:

a) Establecer el volumen de plasma se puede procesar en la columna.

b) Calcular el porcentaje de F que se retiene en la columna después de lavar con buffer, suponiendo que no se pierde F del adsorbente durante esta etapa.

Resp. b) 17.9 %

7.20. Ajuste de datos de equilibrio al modelo de Langmuir. En un estudio sobre la adsorción del plásmido pDNA-CI sobre membranas de intercambio iónico, en un buffer 10 mM tris/1.0 mM de EDTA a pH 8.0 y temperatura ambiente, se obtuvieron los datos de equilibrio siguientes:

c (mg/mL)	0.000	0.019	0.045	0.070	0.107
q (mg/mL)	0.000	2.709	3.922	4.402	6.998
c (mg/mL)	0.155	0.204	0.338	0.455	
q (mg/mL)	9.729	11.023	14.326	14.491	

Se pide:

a) Estimar los parámetros de equilibrio q_m y K_d ajustando el modelo de Langmuir a los datos experimentales, por regresión lineal utilizando el método del doble recíproco.

b) Estimar los parámetros de equilibrio q_m y K_d ajustando el modelo de Langmuir a los datos experimentales, utilizando una regresión no lineal.

c) Graficar los datos experimentales, la curva ajustada mediante regresión lineal y la curva ajustada mediante regresión no lineal, en un sistema coordenado q vs c. **Pista**: Se puede utilizar el programa MATLAB de la Figura 7.46.

7.21 Tiempo medio. Demostrar que en el punto medio de la curva de ruptura de acuerdo al modelo de platos se cumple que:

$$t_0 = \frac{L}{v}\left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)K\right]$$

Figura 7.46: Programa MATLAB para regresión no lineal.

7.7. Bibliografía

Aboudzadeh, M.R.; Jiawen1, Z.; Bin, W. **2006**. Modeling of protein adsorption to DEAE sepharose FF: Comparison of data with model simulation. *Korean. J. Chem. Eng.* 23, 124-130.

Arnold, F.H.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. **1985**. I.- Predicting the performance of affinity adsorbers. II.- The characterization of affinity columns by pulse techniques. *Chem. Eng. J.* 30, B9-B36.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley and Sons. 6, 145-179.

Bird, R.B.; Stewart, W.E.; Lightfoot, E.N. **2002**. *Transport Phenomena.* John Wiley and Sons. New, York. 2da Edición. p. 755.

Clonis, Y.D. **1990**. Process affinity chromatography. En: *Separations Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel, Dekker. New York. 13, 401-445.

Chase, H.A. **1984**. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *J. Chromatogr.* 297, 179-202.

Danckwerts, P.V. **1953**. Continuous flow systems. Distribution of residence times. *Chem. Eng. Sci.* 2, 219-230.

Draeger, N.M.; Chase, H.A. **1990**. Modelling of protein adsorption in liquid fluidized beds. En: *Separations for Biotehnology 2*. Pyle, D.L.(Ed.). Elsevier Applied Science. London. 325-334.

Foo, S.C.; Rice, R.G. **1975**. On the prediction of ultimate separation in parametric pumps. *AIChE J.* 21, 1149-1158.

Gailliot, F.P.; Gleason, C.; Wilson, J.J.; Zwarik, J. **1990**. Fluidized bed adsorption for whole broth extraction. *Biotech. Prog.* 6, 370-375.

Geankoplis, C. J. **1983**. *Transport processes and unit operations.* Allyn and Bacon, MA, 2nd Ed.

Gebauer, K.H.; Thömmes, J.; Kula, M.R. **1997**. Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbers in protein chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 52, 405-419.

Hall, K.R.; Eagleton, L.C.; Acrivos, A.; Vermeulen, T. **1966**. Pore and solid diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions. *IEC Fundamentals.* 5, 212-223.

Helfferich, F.G.; Carr, P.W. **1993**. Non-linear waves in chromatography, I. Waves, shocks, and shapes, *J. Chromatogr. A.* 629, 97-122.

Hiester, N.K.; Vermeulen, T. **1952**. Saturation performance of ion-exchange and adsorption columns, *Chem. Eng. Prog.* 48, 505-516.

Horstmann, B.J.; Chase, H.A. **1989**. Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein A inmobilised to agarosa matrices. *Chem. Eng. Res. Des.* 67, 243-254.

Levenspiel, O. **1962**. *Chemical Reaction Engineering.* John Wiley and Sons. New York. 14, 426-489.

Montesinos, R.M.; Tejeda-Mansir, A; Guzmán, R; Ortega, J.; Schiesser, W.E. **2005**. Analysis and simulation of frontal affinity chromatography of proteins. *Sep. Purif. Technol.* 42, 75–84.

Payne, G.F. **1989**. Bioseparations of traditional fermentations products. En: *Chemical Engineering Problems in Biotechnology.* Schuler, M.L. (Ed). AIChE. New York. 1, 183-207.

Polson, A. **1950**. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *J. Phys. Chem.* 54, 649-652.

Prazeres, D.M.F. **2008**. Prediction of diffusion coefficients of plasmids. *Biotech. Bioeng.* 99, 1040-1044.

Pungor, E.; Afeyan, N.B.; Gordon, N.F.; Cooney C.L. **1987**. Continuous affinity-recycle extractions: A novel potein separation technique. *Bio/Technology.* 5, 604-608.

Ruthven, D.M. **1987**. Adsorption kinetics and adsorption column dynamics. En: *Fundamental of Adsorption.* Liapis, A.I. (Ed.).

Schroder, M.; von Lieres, E.; Hubbuch, J. **2006**. Direct quantification of intra-particle protein diffusion in chromatographic media. *J. Phys. Chem. B.* 110, 1429-1436.

Skidmore, G.L.; Horstmann, B.J.; Chase, H.A. **1990**. Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger Sepharose FF. *J. Chromatog.* 498, 113-128.

Strauss, D.M.; Gorrell, J.; Plancarte, M.; Blank, G.S.; Chen, Q.; Yang, B. **2009**. Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products. *Biotech. Bioeng.* 102, 168-175.

Thomas, H.C. **1944**. Heterogeneous ion exchange in a flowing system, *J. Am. Chem. Soc.* 66, 1664-1666.

Torres, J.L.; Guzmán, R.; Carbonell, R.G.; Kilpatrick, D.K. **1988**. Affinity surfactants as reversibly bound ligands for high-performance affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 171, 411-418.

Vermeulen, T.; Klein, G.; Hiester, N.K. **2007**. Adsorption and ion exchange. En: *Chemical Engineer's Handbook.* Perry, H.R. y Chilton, C.H. (Eds.). McGraw-Hill. 8 ed. New York. 16, 1-50.

Vijayalakshmi, M.A. **1989**. Pseudobioespecific ligan affinity chromatography. *TibTech.* 7, 71-76.

Wang, N.L. **1990**. Ion exchange in purification. En: *Separations Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel, Dekker. New York. 12, 359-400.

Yang, C.; Tsao, G.T. **1982**. Packed-bed adsorption theories and their applications to affinity chromatography. En: *Advances of Biochemical Engennering.* Flechter, A. (Ed.). Springer-Verlag. New York. 25, 1-18

Yarmush, M.L.; Cotton, C.K. **1985**. Affinity chromatography. En: *Comprehensive Biotechnology.* Murray, M.Y. (Ed.). Permagon Press. New York. 32, 507-521.

Parte IV

Purificación del Producto

Una vez que los caldos biológicos han sido concentrados el paso siguiente dentro de un esquema general de separación, es la purificación del producto de interés. En esta Parte IV del libro se presentan los principios generales de las operaciones más utilizadas para efectuar esta purificación: la cromatografía por elución, la precipitación, la ultrafiltración y la electroforesis.

En el Capítulo 8 se presenta la operación de cromatografía por elución que puede analizarse empleando gran parte de los conceptos utilizados para describir la adsorción en lecho fijo revisada en el capítulo anterior. En el Capítulo 9 se presenta la operación de precipitación, que requiere un enfoque fuertemente fisicoquímico muy característico de esta operación. En los Capítulos 10 y 11, se presentan las operaciones de ultrafiltración y electroforesis dado que sus principios permiten un enfoque unificado.

Capítulo 8

Cromatografía por Elución

8.1. Introducción

La mayoría de los bioprocesos involucran al menos una operación cromatográfica que frecuentemente es la clave para la factibilidad técnica del proceso de separación. Aunado a que es una operación relativamente cara, se debe tener un especial cuidado en su escalamiento.

La cromatografía por elución es un método para separar en sus componentes (resolver) una mezcla de solutos y es empleada con el propósito de purificar productos de interés (Asenjo y Andrews, 2009). Ésta se efectúa en columnas empacadas con adsorbentes que pueden ser sólidos, sólidos porosos o geles. El adsorbente constituye la fase estacionaria de la columna.

En la operación de una columna cromatográfica se aplica una pequeña cantidad de muestra en la parte superior de la columna. Una vez colocada la mezcla se hace pasar un líquido que favorezca la desorción llamado eluyente (fase móvil). Conforme avanzan los solutos sobre la columna éstos se separan permitiendo su purificación.

En la cromatografía por elución isocrática la composición del eluyente se mantiene constante durante el proceso. En la elución por gradiente la composición del eluyente se varía gradualmente.

La operación de una columna cromatográfica es similar a la de una columna de adsorción. Sin embargo, en la cromatografía por elución la columna no se satura completamente con soluto, sino que sólo se carga en forma controlada una porción de ésta.

La decisión entre emplear adsorción frontal o cromatografía por elución en una separación, radica principalmente en la dilución del soluto. Por ejemplo, si se desea remover de una solución acuosa diluida dos compuestos orgánicos A y B muy similares, la operación apropiada es una adsorción frontal. Por otro lado, si estos mismos compuestos se desean separar entre sí con una alta pureza a partir de una muestra concentrada, la selección apropiada es la cromatografía por elución. Entre estos dos casos extremos de separaciones en columna, se han

desarrollado otros modos intermedios como la cromatografía por desplazamiento y la de recirculación.

En la Figura 8.1 se representa la separación cromatográfica de una mezcla de tres solutos. Cada soluto tiene diferente grado de retención en la columna de tal manera que la velocidad de avance de cada uno es diferente, siendo el soluto A (círculo) el más lento y el soluto C (triángulo) el más rápido.

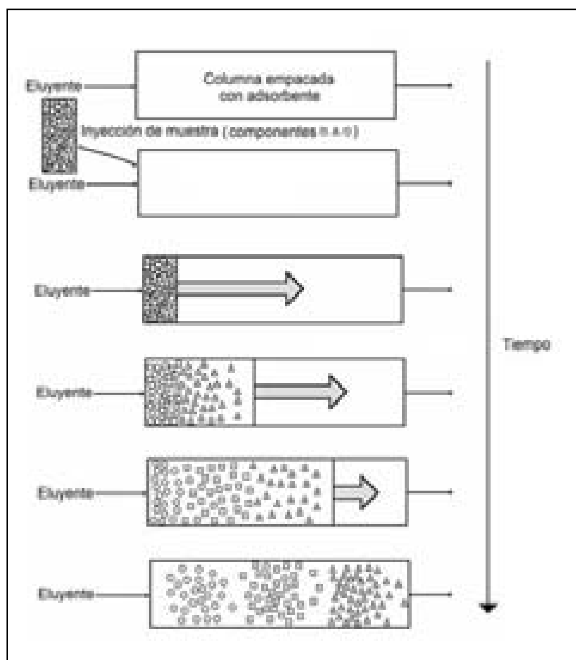


Figura 8.1: Esquema de una columna cromatográfíca. Adaptada de: Belter *et al.*, 1988.

Un detector de solutos a la salida de la columna obtendría una gráfica como la de la Figura 8.2, llamada cromatograma.

En la cromatografía por elución el soluto se purifica a expensas de cierto grado de dilución, mientras que en la adsorción frontal el soluto se retiene en la columna y posteriormente se eluye concentrado.

Para abordar el tema de cromatografía por elución en la sección 8.2 de este capítulo se presentan los fundamentos de la cromatografía, describiendo las principales técnicas cromatográficas, tipos de adsorbentes, las relaciones de equilibrio y cinéticas que son utilizadas en esta operación. En la sección 8.3 se revisan los principales equipos utilizados en las operaciones cromatográficas. En la sección 8.4 se presentan algunos de los modelos para el diseño de equipos cromatográficos que nos permiten predecir y analizar los perfiles de concentración o cromatogramas.

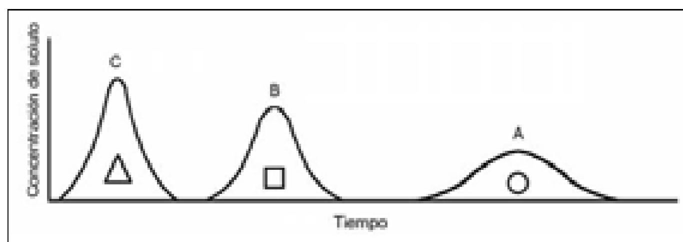


Figura 8.2: Cromatograma típico. Adaptada de: Belter *et al.*, 1988. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons. Copyright ©1988. Todos los derechos reservados.

8.2. Fundamentos

Existen varias técnicas cromatográficas basadas en la interacción de una fase móvil líquida y una fase estacionaria. Cinco aspectos fundamentales permiten distinguir las semejanzas y diferencias entre ellas:

- El principio de separación que emplea cada una de ellas.
- Las características de las matrices que utilizan.
- La presión a la que se operan.
- La relación de equilibrio del sistema cromatográfico.
- La cinética de la adsorción.

8.2.1. Tipos de Cromatografía Líquida: Principio de Separación

De acuerdo al principio utilizado para la separación se pueden distinguir tres tipos básicos de cromatografía por elución: la cromatografía líquido-líquido, la cromatografía de filtración en gel o cromatografía por exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía por adsorción.

Cromatografía líquido-líquido

En la cromatografía líquido-líquido se utiliza un adsorbente sólido impregnado con un líquido que funciona como fase estacionaria. La separación de los solutos es resultado de las diferencias en los coeficientes de partición de cada uno de los solutos de la mezcla entre las fases líquidas (estacionaria y móvil).

Cromatografía por filtración en gel

La cromatografía por filtración en gel utiliza partículas fabricadas de geles porosas que actúan como mallas moleculares que permiten separar moléculas en

función de su tamaño. Este tipo de cromatografía es comúnmente empleada en las últimas etapas de los procesos de obtención de productos biotecnológicos.

Cromatografía por adsorción

La cromatografía por adsorción emplea adsorbentes en los que los solutos a separar presentan diferentes grados de retención. Existen varias modalidades caracterizadas básicamente por el tipo de adsorbente que emplean, llamadas cromatografía de adsorción: física, de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, de fase reversa y de afinidad.

Cromatografía de adsorción simple La cromatografía por adsorción simple se caracteriza por la unión del soluto al adsorbente por fuerzas débiles del tipo de van Der Waals. Este tipo de cromatografía es poco selectiva entonces se utiliza poco a nivel analítico, pero por su bajo costo es utilizada a nivel industrial.

Cromatografía por intercambio iónico La cromatografía por intercambio iónico se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos de carga contraria de los adsorbentes.

Cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de fase reversa Tanto la cromatografía de interacción hidrofóbica como la de fase reversa, se basan en la interacción entre las regiones hidrofóbicas de las biomoléculas y los grupos hidrofóbicos de los adsorbentes empleados.

Cromatografía por afinidad La cromatografía por afinidad está basada en interacciones altamente específicas entre el soluto de interés y el adsorbente. Este tipo de cromatografía es muy empleada en la purificación de proteínas. Los adsorbentes utilizados en esta cromatografía presentan grupos químicos llamados ligandos que son altamente específicos para la unión con los solutos.

8.2.2. Matrices

Actualmente diversos tipos de materiales o matrices son utilizados para fabricar los soportes (empaques) de las columnas cromatográficas. En algunos casos estos materiales se modifican químicamente para incrementar su especificidad. Alrededor del 90 % de las matrices que se emplean actualmente están hechas de materiales que forman geles de alto poder hidratante, los cuales se comercializan en forma de pequeñas esferas cuyo diámetro varía entre 10 y 100 μm.

La Figura 8.3 muestra la estructura química de algunas de las matrices empleadas en cromatografía. En general los materiales de las matrices pueden ser de cuatro tipos:

1. Materiales inorgánicos: sílica porosa, vidrio de poro controlado (marca Spherosil) e hidroxiapatita.

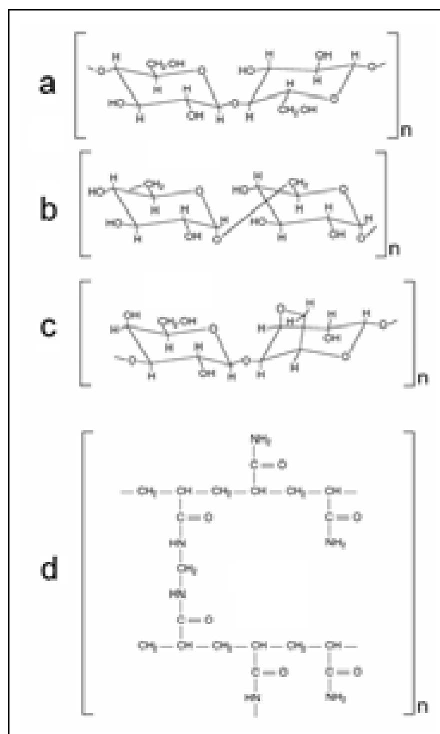


Figura 8.3: Estructuras de matrices. a) Celulosa (β 1-4), b) Dextrano (α 1-6), c) Agarosa y d) Poliacrilamida entrecruzada. Fuente: Janson, 1989.

2. Polímeros orgánicos sintéticos: poliacrilamida (marca Biogel P), polimetacrilato (marca Spheron) y poliestireno.

3. Polisacáridos: celulosa (marcas Whatman, Cellulofine y Sephacel), dextrano (marca Sephadex) y agarosa (marcas Sepharosa, Superosa, Ultrogel A y BioGel).

4. Compuestos polímeros orgánicos con polisacáridos: poli-N, N'-bisacrilamida con dextrano (marca Sephacryl), agarosa con dextrano (marca Superdex) y agarosa con poliacrilamida (marca Ultrogel AcA).

Desde el punto de vista funcional se pueden distinguir dos tipos de geles: microporosos y macroporosos (Fig. 8.4).

Los geles microporosos se obtienen por entrecruzamiento puntual de polímeros lineales como celulosa, dextrano y la poliacrilamida. Este tipo de geles son utilizados en cromatografía de filtración en gel y tienen baja resistencia mecánica. Los geles macroporosos se obtienen por entrecruzamiento y agregación de polímeros, como la agarosa y la poliacrilamida macroreticular. Este tipo de geles son empleados en cromatografía de intercambio iónico y de afinidad donde

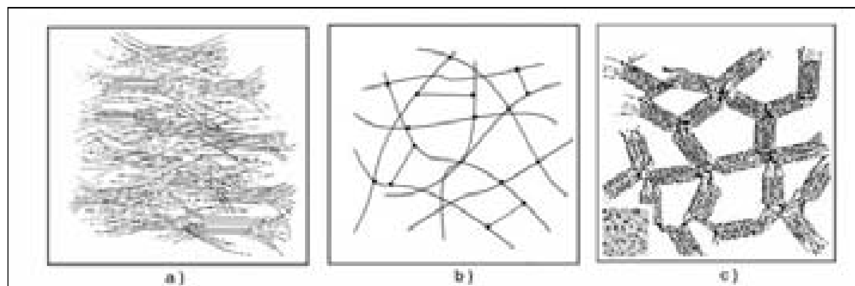


Figura 8.4: Matrices microporosas y macroporosas. a) Celulosa, b) Polímeros entrecruzados como poliacrilamida y dextrano y c) Agarosa. Fuente: Janson, 1989.

se requieren poros más grandes. Los geles compuestos se forman al introducir geles de microporos en los poros de los geles de macroporos, para combinar las ventajas de ambos tipos de materiales.

De acuerdo a su comportamiento con relación al solvente, se pueden distinguir dos tipos de geles: xerogeles y aerogeles. Los xerogeles se caracterizan por arrugarse e hincharse en la ausencia y presencia del solvente, respectivamente. Por otro lado, el volumen de los aerogeles es independiente del solvente. Los geles de dextrano entrecruzado (Sephadex) y los de poliacrilamida, pertenecen a los xerogeles; mientras que los geles de vidrio poroso, sílica, poliestireno y polimetacrilato son aerogeles.

Tipo de cromatografía y tipo de matriz

Existe una relación directa entre el tipo de cromatografía y el tipo de matriz empleada, a continuación se presentan algunos ejemplos particulares.

Cromatografía líquido-líquido En la cromatografía líquido-líquido se emplean partículas de tierras diatomeas impregnadas con propilenglicol. Esta técnica es poco selectiva por lo que no es muy utilizada en el laboratorio, pero debido a su bajo costo es utilizada a escala industrial.

Cromatografía de filtración en gel En la cromatografía de filtración en gel se emplean básicamente geles de microporos de dextrano o poliacrilamida.

Cromatografía por adsorción Los procesos cromatográficos basados en la adsorción simple de solutos en un adsorbente sólido poroso, utilizan adsorbentes como alúmina y sílica-gel. Como ya se ha mencionado este tipo de adsorbentes son poco selectivos, pero debido a su bajo costo este tipo de cromatografía también se aplica sólo en separaciones en procesos industriales.

La cromatografía por intercambio iónico es una de las más utilizadas a nivel industrial para la purificación de diferentes tipos de compuestos. Las resinas utilizadas son de dos tipos: catiónicas y aniónicas, dependiendo del grupo iónico (Fig. 8.5).

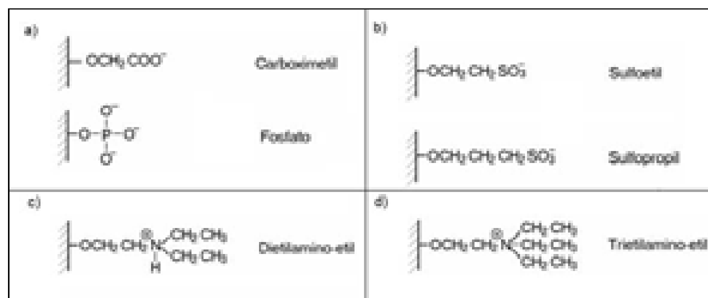


Figura 8.5: Grupos funcionales de adsorbentes iónicos. a) Catiónico débil, b) Catiónico fuerte, c) Aniónico débil y d) Aniónico fuerte.

En las técnicas cromatográficas de interacción hidrofóbica y fase reversa, la fase estacionaria consiste de una matriz con ligandos no polares (Fig. 8.6). La separación se basa en el hecho de que algunas biomoléculas como las proteínas presentan residuos externos no polares, de tal manera que en soluciones no acuosas estos tienden a interaccionar con los ligandos no polares de los soportes.

Fenil	C_6H_5-
Octadecil	$-(CH_2)_{17}-CH_3$
Octil	$-(CH_2)_7-CH_3$
Butil	$-(CH_2)_3-CH_3$
Etil	$-CH_2-CH_3$

Figura 8.6: Grupos funcionales típicos de la cromatografía de interacción hidrofóbica y de fase reversa.

Las interacciones hidrofóbicas entre la biomolécula y el ligando del soporte, se fortalecen utilizando medios con altas concentraciones salinas, por ejemplo: sulfato de amonio a una concentración cercana a la de precipitación de la de la biomolécula. Para eluir las biomoléculas se utiliza una solución con concentración salina baja o un solvente de baja polaridad.

En la cromatografía de fase reversa no se utilizan solventes de baja polaridad para eluir, para evitar la desnaturalización de las proteínas, y ese es su rasgo distintivo respecto a la cromatografía de interacción hidrofóbica.

En la cromatografía con iones metálicos, el adsorbente presenta iones metálicos inmovilizados sobre el soporte por medio de grupos quelantes como el ácido iminodiacético. El tipo de iones más utilizados son el Cu^{+2} y el Zn^{+2}. Estos iones interactúan con los grupos cargados de las proteínas como es el caso de los residuos de histidina.

La cromatografía que utiliza colorantes como ligandos, se basa en el hecho que cierto tipo de estos colorantes interactúan fuertemente con los grupos aniónicos de las proteínas. Los colorantes asemejan estructuras biológicas como los cofactores NAD y ATP y permiten la interacción con ciertas proteínas. La ventaja es que son más baratos que dichos cofactores, más fáciles de unir a las matrices y más estables (Fig. 8.7).

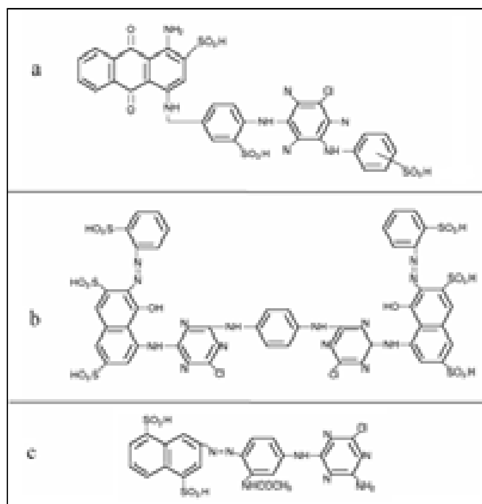


Figura 8.7: Colorantes utilizados como ligandos. a) Azul A, b) Rojo A y c) Naranja A.

Otro tipo de cromatografía utiliza ligandos biológicos altamente específicos para ciertos sustratos. Las diferentes modalidades de la adsorción por afinidad se presentan en la Figura 7.8.

8.2.3. Tipo de Cromatografía por Presión de Operación

De acuerdo al tamaño de partícula y a la presión de operación que emplea, la cromatografía líquida se puede clasificar en cromatografía de presión baja, presión moderada y presión alta (la cromatografía líquida a presión alta es característica de la técnica llamada cromatografía líquida de alta resolución, HPLC de sus siglas en inglés). En la Tabla 8.1 se presentan las presiones y el tamaño de partícula características de cada una de ellas.

Tabla 8.1: Tipos de cromatografías de acuerdo a su presión de operación.

Tipo	Presión (atm)	Diámetro (μm)
Baja	1	90-100
Moderada	2-50	30-50
Alta	51-350	5-10

8.2.4. Relaciones de Equilibrio

En el análisis de columnas cromatográficas, las relaciones de equilibrio se expresan por medio de isotermas de adsorción o curvas que relacionan la concentración en el equilibrio del soluto en la fase estacionaria y del soluto en la fase móvil. Dichas isotermas son generalmente no lineales mostrando comportamientos tipo Langmuir o Freundlich. Estas isotermas son iguales a las descritas en el capítulo anterior.

8.2.5. Cinética de la Adsorción

Algunos modelos utilizados para describir una operación cromatográfica toman en cuenta las resistencias a la transferencia de masa involucradas en el proceso, las cuales pueden ser descritas mediante un mecanismo de cinco pasos:

1. Difusión del soluto del seno del líquido a través de una película de líquido que rodea al adsorbente.
2. Difusión del soluto dentro del poro del adsorbente.
3. Reacción reversible del soluto con el adsorbente (la reacción puede involucrar adsorción, reacción y desorción de superficie).
4. Contradifusión del soluto en el poro hacia la superficie del adsorbente.
5. Contradifusión del soluto de la superficie del adsorbente hacia el seno del líquido, a través de la película de líquido.

Generalmente uno o dos de los pasos descritos anteriormente son los más lentos, de tal manera que son los que controlan la velocidad global de transporte del soluto.

8.3. Equipos Cromatográficos

Los principales equipos cromatográficos son columnas fabricadas en plástico, vidrio o acero inoxidable. Las columnas para cromatografía en gel tienen relaciones L/D muy bajas, en el rango de 0.3 a 3.0; con diámetros máximos de 1.5 m. En el caso de geles blandos la longitud necesaria de la columna se alcanza por medio de sistemas de varias de columnas cortas (Curling, 2007).

Las columnas empleadas en cromatografía HPLC tienen diámetros de hasta 80 cm y altura de lecho de 120 cm (Fig. 8.8). Este tipo de columnas deben ser empacadas utilizando sistemas hidráulicos que permitan el manejo adecuado del empaque.

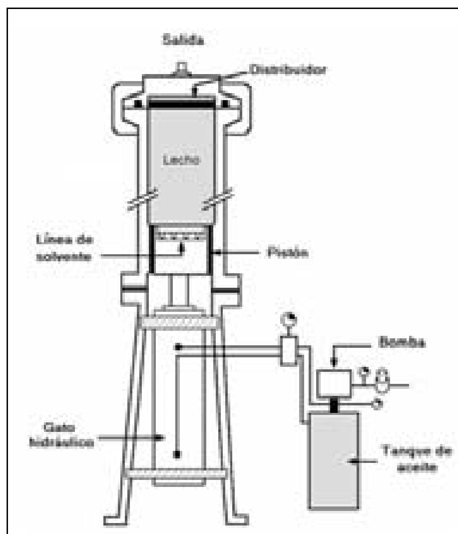


Figura 8.8: Columna cromatográfica. Adaptada de: Nicoud y Perrut, 1991. Reproducida con el permiso de Kluwer Academic Publishers. Copyright ©1991. Todos los derechos reservados.

8.4. Diseño de Columnas Cromatográficas

La obtención de productos biotecnológicos con grados de pureza y mercados cada vez mayores, ha creado la necesidad de llevar a escala de proceso las técnicas que tradicionalmente se utilizan sólo a nivel laboratorio. Es en esta transición donde los conocimientos ingenieriles juegan un papel muy importante.

Una de las técnicas que ha recibido más atención en este sentido es la cromatografía, particularmente en el arreglo tipo columna de lecho fijo. Tres conceptos se combinan para lograr un diseño apropiado de estas columnas cromatográficas:

- El modelo de la columna.
- Los criterios para la evaluación técnica del comportamiento de la columna: Resolución, Pureza y Rendimiento.
- Los procedimientos de escalamiento y optimización de la columna.

8.4.1. Teoría de Cromatografía Lineal

Los enfoques utilizados para describir los procesos cromatográficos están basados principalmente en dos aspectos: a) tipo de isoterma: lineal o no lineal y b) presencia o ausencia de efectos cinéticos (dispersión, resistencia a la transferencia de masa o cinética finita). Estos efectos cinéticos son responsables de la eficiencia finita de las columnas reales. Cuando estos efectos se desprecian y se supone que las columnas presentan una eficiencia infinita los modelos se conocen como ideales. Estas consideraciones conducen a 4 tipos de modelos cromatográficos frecuentemente encontrados en la literatura: a) lineales ideales, b) lineales no ideales, c) no lineales ideales y d) no lineales no ideales.

Varios modelos empleados para el análisis y diseño de columnas cromatográficas que operan bajo condiciones isocráticas, utilizan isotermas lineales para describir las relaciones de equilibrio que se presentan en éstas, debido a que por su simplicidad dichos modelos pueden ser resueltos analíticamente para obtener los perfiles de concentración tipo campana de Gauss, que se observan experimentalmente en algunos cromatogramas.

La suposición de una isoterma lineal se puede justificar en función de que un gran número de sistemas cromatográficos se trabajan con muestras pequeñas, de tal manera que el rango de concentraciones en la columna es bajo, y puede ser situado en el rango lineal de cualquier tipo de isoterma (en la región de baja concentración). El trabajar con muestras pequeñas permite tener una buena separación de los solutos de la mezcla (resolución) a expensas de un bajo rendimiento o cantidad de muestra que puede ser procesada. Sin embargo, es conveniente establecer que este enfoque tiene sus limitaciones, principalmente para los sistemas cromatográficos muy selectivos como los de afinidad.

Cuando la elución es por gradiente, las relaciones de equilibrio varían conforme cambia la composición de los eluyentes y los modelos basados en isotermas lineales no son aplicables directamente. Actualmente se cuenta con algunas técnicas cromatográficas que emplean otros principios como es la cromatografía por desplazamiento y la de cambio cíclico de la zona de adsorción, donde tampoco son aplicables los modelos basados en isotermas lineales. A nivel preparativo la cromatografía por elución se utiliza bajo condiciones de sobrecarga con el propósito de incrementar la productividad de la columna; esto puede lograrse incrementando el volumen o la concentración de la muestra (Fig. 8.9). Bajo estas condiciones la aplicación de los modelos lineales también es limitada.

8.4.2. Modelos lineales

Esta sección sólo se refiere a los principios básicos de la cromatografía por elución isocrática en columna y principalmente a los modelos basados en isotermas lineales. Existen tres enfoques básicos para la obtención de estos modelos cromatográficos de columnas:

a) La teoría de platos.

b) La teoría cinética.

  i) Modelo cinético lineal.

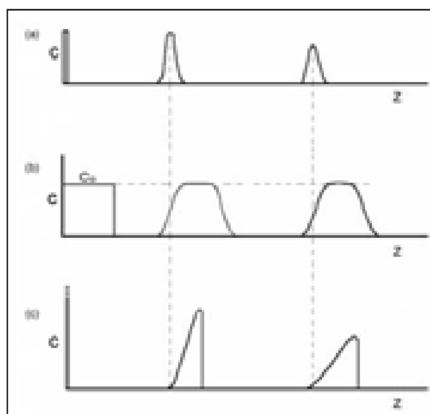


Figura 8.9: Cromatografía analítica y preparativa. a) Analítica, b) Sobrecarga de volumen y c) Sobrecarga de concentración. Fuente: Knox y Pyper, 1986.

ii) Modelo cinético de tres resistencias: teoría de momentos.

c) Teoría de platos-cinética.

i) Modelo lineal.

ii) Modelo de van Deemter.

Teoría de platos teóricos o etapas

Los modelos de platos teóricos son de los más utilizados en el análisis de la cromatografía por elución. Sin embargo, estos modelos tienen sus limitaciones en lo que se refiere al diseño y escalamiento de columnas, por lo que su uso es cada vez más limitado. Esto es debido a que estos modelos son esencialmente empíricos y no pueden relacionarse con principios fundamentales.

En los modelos de platos se supone que la columna se comporta como una serie de etapas en equilibrio. Se han derivado dos tipos de estos modelos: el de Craig (Capítulo 6) el cual supone operación por lotes y el de Martin-Synge que supone una operación continua.

En el desarrollo del modelo de platos teóricos de Martin-Synge, cada etapa puede visualizarse como un adsorbedor tipo tanque de volumen constante. El solvente fluye de un tanque hacia el otro, mientras que el adsorbente permanece fijo en su tanque respectivo (Fig. 8.10).

El balance de masa del soluto para la etapa n puede ser escrito como:

$$\text{Acumulación en el líquido} = \text{Entrada} - \text{Salida} - \text{Adsorción}$$

lo cual pude ser expresado mediante la siguiente ecuación:

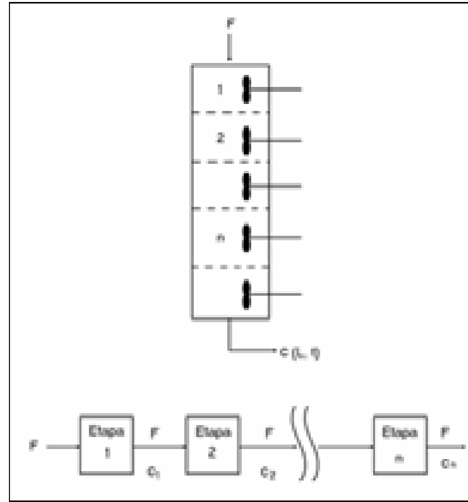


Figura 8.10: Representación de una columna cromatográfica con el modelo de platos.

$$\varepsilon V_E \frac{dc_n}{dt} = Fc_{n-1} - Fc_n - (1-\varepsilon)V_E \frac{dq_n}{dt} \tag{8.1}$$

donde:

V_E: Volumen de la etapa (líquido más adsorbente).

ε : Volumen del líquido por volumen de etapa.

F: Flujo de alimentación.

c_n: Concentración de soluto en la solución en la etapa n.

q_n: Concentración de soluto en el adsorbente en la etapa n.

El modelo supone que cada etapa está en equilibrio y que la relación de equilibrio está dada por una isoterma lineal, de tal manera que en cada etapa la relación de concentraciones puede ser expresada como:

$$q_n = Kc_n \tag{8.2}$$

Combinando las ecuaciones (8.1) y (8.2) se obtiene:

$$\{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]\, V_E\} \frac{dc_n}{dt} = F(c_{n-1} - c_n) \tag{8.3}$$

donde la cantidad entre corchetes es un volumen hipotético de líquido $V^* =$

$[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]V_E$ que contiene al soluto de las fases líquida y sólida (de tal manera que la expresión (8.3) es equivalente a un balance de masa de un tanque de volumen V^* con entrada y salida).

La ecuación (8.3) puede ser resuelta con las siguientes condiciones:

1. Inicialmente ninguna etapa contiene soluto.

$$\text{para} \quad t < 0, \qquad c_n = 0 \quad \text{para } n = 1, 2, \ldots N$$

donde N es el número total de etapas en la columna.

2. Al inicio de la operación de la columna se inyecta un pulso muy corto de tal manera que:

$$\text{para} \quad t = 0, \qquad c_1 = c_A$$

(lo anterior corresponde a considerar que la masa de soluto que se alimenta a la primera etapa en el tiempo cero es $M = V^* c_A$).

La forma integrada es:

$$c_n = c_A \left[\frac{\tau^{N-1} e^{-\tau}}{(N-1)!} \right] \tag{8.4}$$

donde el tiempo adimensional τ está dado por:

$$\tau = \frac{Ft}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]V_E} \tag{8.5}$$

o bien

$$\tau = \frac{Ft}{V^*}$$

como el volumen total del lecho V_c se puede expresar como: $V_c = NV_E$, entonces la ecuación (8.5) también puede ser expresada de la siguiente forma:

$$\tau = \frac{NFt}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]V_c} \tag{8.6}$$

La ecuación (8.4) es la expresión de una distribución de Poisson. Para N grandes (mayores a 30) ésta se aproxima a una distribución de Gauss (Fig. 8.11), característica de los cromatogramas que se observan experimentalmente en comatografías de laboratorio donde la cantidad de muestra es pequeña.

En el modelo de platos teóricos la variación de la concentración de soluto a la salida de la columna con el tiempo, puede aproximarse con la ecuación de una distribución de Gauss, de tal manera que:

$$c = c_o \exp\left[-\frac{(\tau - \tau_o)^2}{2\sigma_A^2} \right] \tag{8.7}$$

donde:

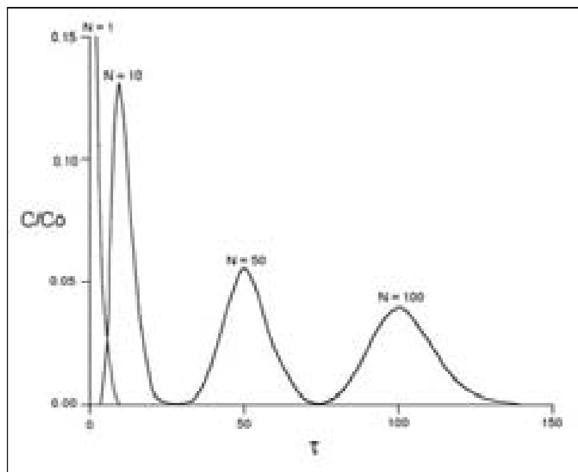


Figura 8.11: Aproximación de la distribución de Poisson a la de Gauss.

c_o: Concentración máxima de soluto a la salida de la columna.

σ_A: Desviación estándar del perfil de concentración de soluto.

τ_o: Tiempo adimensional para el cual la concentración de salida es máxima (tiempo adimensional de retención).

Parámetros del modelo de platos La ecuación (8.7) relaciona la concentración c con los parámetros c_o, σ_A y τ_o; y con la variable τ. Para poder utilizar dicha ecuación es necesario relacionar estos parámetros con el sistema físico particular.

El parámetro c_o puede ser relacionado con el sistema mediante un balance de masa en toda la columna. De este balance se obtiene la expresión de la masa M de soluto alimentada al sistema,

$$M = \int_0^\infty Fcdt \tag{8.8}$$

la cual puede ser aproximada a

$$M \doteq \int_{-\infty}^{\infty} Fcdt \tag{8.9}$$

la ecuación anterior se integra combinándola con la ecuación (8.7), sustituyendo dt por $V^*d\tau/F$, y multiplicando y dividiendo por $(2\pi)^{\frac{1}{2}}\sigma_A$, de tal manera que:

$$M = \left[(2\pi)^{\frac{1}{2}}\sigma_A\right](V^*c_o)\left\{\frac{1}{(2\pi)^{\frac{1}{2}}\sigma_A}\int_{-\infty}^{\infty}\exp\left[-\frac{(\tau-\tau_o)^2}{2\sigma_A^2}\right]d\tau\right\} \tag{8.10}$$

puede encontrarse en cualquier texto de probabilidad y estadística que la expresión entre corchetes de la ecuación anterior vale uno, de tal manera que:

$$M \doteq (2\pi)^{\frac{1}{2}}\sigma_A V^* c_o \tag{8.11}$$

como $M = V^* c_A$, entonces,

$$c_o \doteq \frac{c_A}{(2\pi)^{\frac{1}{2}}\sigma_A} \tag{8.12}$$

que es la expresión que se busca para el primer parámetro.

Mediante las definiciones de media y desviación estándar, y utilizando la ecuación (8.4), es posible relacionar σ_A y τ_o con el número de etapas de la columna, de tal manera que:

$$\tau_o = N \tag{8.13}$$

y

$$\sigma_A^2 = N \tag{8.14}$$

Mediante la ecuación (8.5) se puede definir un τ_o, dado por:

$$\tau_o = \frac{NFt_o}{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]V_c} \tag{8.15}$$

como $\tau_o = N$, entonces:

$$t_o = \frac{[\varepsilon + (1-\varepsilon)K]V_c}{F} \tag{8.16}$$

El tiempo real de retención de un soluto en la columna, es función del tiempo de residencia del fluido en la columna (V_c/F), la porosidad ε del lecho y la constante K.

Finalmente, la ecuación (8.7) puede ser escrita en términos de las características y condiciones de la columna como:

$$c = c_o \exp\left[-\frac{\left(\frac{t}{t_o}-1\right)^2}{\frac{2}{N}}\right] \tag{8.17}$$

La ecuación (8.17) es una distribución normal que tiene un máximo en $t = t_o$ igual a:

$$c_o = \frac{c_A}{(2\pi N)^{\frac{1}{2}}}$$

y una desviación estándar:

$$\sigma = \frac{t_o}{\sqrt{N}}$$

La ecuación (8.17) también puede expresarse en términos del volumen V de solvente añadido a la columna, considerando un flujo constante, de tal manera que:

$$t = \frac{V}{F} \tag{8.18}$$

$$t_o = \frac{V_o}{F} \tag{8.19}$$

y entonces,

$$c = c_o \exp\left[-\frac{\left(\frac{V}{V_o} - 1\right)^2}{\frac{2}{N}}\right] \tag{8.20}$$

Aplicación del modelo de platos Las ecuaciones (8.17) y (8.20) pueden ser utilizadas para estimar el número de etapas de una columna a partir de datos experimentales de concentración contra tiempo. Una vez calculada N y contando con la longitud de la columna L, se puede obtener la altura equivalente de un plato teórico ($HETP$ de sus siglas en inglés) de la columna, la cual es una medida de la eficiencia de ésta, mediante la siguiente ecuación:

$$HETP = \frac{L}{N} \tag{8.21}$$

Asimismo, dichas ecuaciones han demostrado ser útiles en el análisis de la dispersión y la resolución de los picos de un cromatograma. Sin embargo, no pueden ser utilizadas para predecir el número de etapas o la altura equivalente de un plato teórico, ni para predecir en que forma el cambio de las condiciones de operación de la columna afecta su comportamiento.

Ejemplo 8.1. Cálculo del número de etapas en la cromatografía de Inmunoglobulina G.

La cromatografía de perfusión-afinidad de alta resolución de Inmunoglobulina G (Fulton *et al.,* 1991) produce un cromatograma con un pico cuyo tiempo

medio de retención es de 32.5 s. El ancho del pico cuando la concentración es la mitad de la máxima es de 1.60 s.

Se pide: Estimar el número de etapas teóricas de esta columna.

Solución:

Se puede utilizar la ecuación (8.17) para determinar el número de etapas teóricas de la columna. Sustituyendo valores,

$$0.5 = \exp\left[-\frac{\left(\dfrac{32.5+\dfrac{1.6}{2}}{32.5}-1\right)^2}{\dfrac{2}{N}}\right]$$

aplicando logaritmos en ambos lados de la expresión anterior se obtiene,

$$N = 2,287$$

Es importante hacer notar que entre más ancho sea el pico del cromatograma, N será más pequeña y por lo tanto $HETP$ más grande, y viceversa. Consecuentemente, la $HETP$ es una medida de la amplitud de un pico cromatográfico (eficiencia de la columna). Entre menor sea $HETP$, mayor eficiencia de la columna.

Métodos gráficos para determinar N Existen varias formas para calcular N a partir de un cromatograma gaussiano. Una de las más utilizadas emplea la siguiente expresión:

$$N = \frac{16\ t_o^2}{W^2} \tag{8.22}$$

donde W es el ancho de la base del cromatograma medido entre las rectas tangentes que pasan por los puntos de inflexión del cromatograma. La teoría de platos es muy utilizada debido a que permite una rápida caracterización y una comparación sencilla entre columnas.

Ejemplo 8.2. Cálculo gráfico del número de etapas teóricas. En la Figura 8.12 se presenta un pico de un cromatograma de transferrina.

Se pide: Estimar el número de etapas teóricas obtenidas en la cromatografía de transferrina.

Solución:

Utilizando la ecuación (8.22) se puede calcular N. Para realizar el cálculo es necesario determinar el ancho del cromatograma,

$$W = 49\ \text{min} - 33\ \text{min} = 16\ \text{min}$$

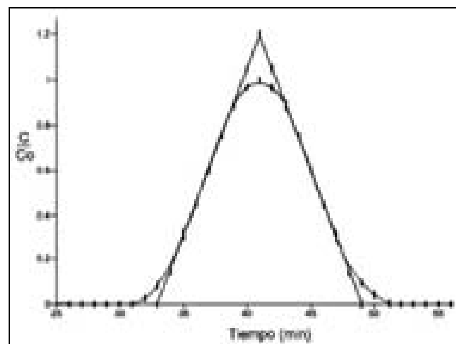


Figura 8.12: Cálculo del número de unidades de transferencia de una columna cromatográfica en forma gráfica.

y el tiempo de retención,

$$t_o = 41 \text{ min}$$

sustituyendo valores,

$$N = \frac{(16)\,(41 \text{ min})^2}{(16 \text{ min})^2} = 105$$

Ejemplo 8.3. Elución con gradiente.

En una columna cromatográfica se aplica un volumen de muestra de tal manera que:

$$\text{para} \quad \theta < 0, \qquad c_n = 0 \quad \text{para} \;\; n = 1, 2, ... \; N$$

$$\text{para} \quad 0 \leq \theta \leq \theta_p, \qquad c_0 = c_0$$

$$\text{para} \quad \theta > \theta_p, \qquad c_0 = 0$$

donde θ_p es la duración del pulso referido a un tiempo adimensional dado por:

$$\theta = \frac{Ft}{\varepsilon V_c}$$

Una vez aplicada la muestra ésta se eluye mediante un gradiente salino que puede expresarse como:

$$i = i_e \quad \text{para} \quad (\theta - \theta_p) \leq \left[1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} K'\right] \left(\frac{n}{N}\right)$$

$$i = i_e + \frac{\Delta i}{\Delta \theta} \left\{ (\theta - \theta_p) - \left[1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} K'\right] \left(\frac{n}{N}\right) \right\}$$

$$\text{para} \qquad (\theta - \theta_p) > \left[1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} K'\right] \left(\frac{n}{N}\right)$$

donde i es la fuerza iónica y K' es una constante de equilibrio de referencia.

Bajo esta condiciones la relación de equilibrio es función de la fuerza iónica y la concentración de tal manera que:

$$q = K(c, i)c$$

Se pide:

a) Utilizando el modelo de platos obtener la expresión de la variación de la concentración de soluto con el tiempo adimensional.

b) Obtener los perfiles de concentración en la columna utilizando los datos siguientes:

$K' = 0.9$	$i_e = 0.7$
$N = 20$	$\Delta i/\Delta\theta = 0.001$
$C_0 = 0.8$	$\theta_p = 0.5$
$\varepsilon = 0.4$	

y la siguiente expresión para la constante de equilibrio:

$$K(c, i) = 0.44 + 2.247 \times 10^{-3} \left(i^{-3.1667}\right)$$

Solución:

a) El balance de soluto en la etapa n es:

$$\varepsilon V_E \frac{dc_n}{dt} = Fc_{n-1} - Fc_n - (1-\varepsilon)V_E \frac{dq_n}{dt}$$

que puede expresarse como:

$$(c_{n-1} - c_n) = \frac{1}{N}\frac{dc_n}{d\theta} + \frac{H}{N}\frac{dq_n}{d\theta}$$

donde:

$$H = \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}$$

utilizando la regla de la cadena para desarrollar el término $dq_n/d\theta$ de la ecuación anterior se obtiene:

$$\frac{dC_n}{d\theta} = \frac{N\left(C_{n-1} - C_n\right) - \dfrac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} C_n \left[\dfrac{dK(c,i)}{di}\right]\left(\dfrac{di}{d\theta}\right)}{1 + \dfrac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}\left[K(C,i) + C_n \dfrac{dK(C,i)}{dC_n}\right]}$$

donde:

$$C = \frac{c}{c_0}$$

b) En este caso particular $dK(C,i)/dC_n = 0$. En la Figura 8.13 se presenta un programa MATLAB para obtener los perfiles de concentración en cada una de las etapas, los cuales se muestran en la Figura 8.14.

Figura 8.13: Programa MATLAB del Ejemplo 8.3.

Teoría cinética

Los modelos basados en la teoría cinética describen el comportamiento de una cromatografía mediante los perfiles de concentración de los solutos obtenidos mediante balances de masa, relaciones de equilibrio y expresiones cinéticas. Este enfoque resulta más complejo que el de la teoría de platos pero permite mejorar la descripción y comprensión de estos sistemas.

Para iniciar la revisión de algunos modelos cinéticos es conveniente describir cuatro comportamientos generales de una columna cromatográfica operando en modo elución isocrática, descritos en la Figura 8.15.

Caso 1 Un pulso inyectado a una columna no sufrirá ningún cambio a la salida de la columna, sólo si: a) el flujo en la columna es ideal o tipo tapón, b) los solutos no penetran al interior del adsorbente y c) los solutos no reaccionan (no se adsorben) con el adsorbente.

Caso 2 Un pulso inyectado a una columna donde exista un cierto grado de flujo no ideal debido a un empaque deficiente o a fenómenos de difusión axial, pero no exista adsorción, presentará un tiempo de retención promedio igual al del pulso del caso 1, pero con cierto grado de dispersión.

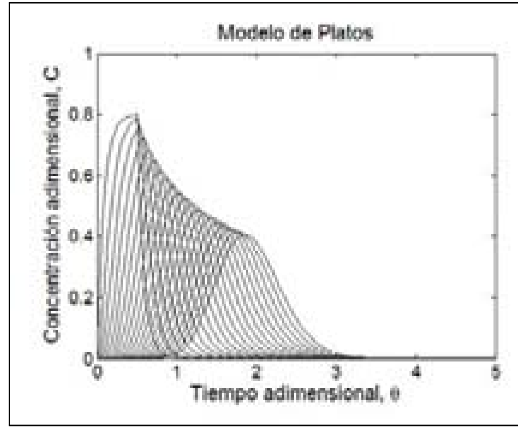


Figura 8.14: Perfiles de concentración de soluto del Ejemplo 8.3.

Caso 3 Un pulso que contenga un soluto que pueda ser adsorbido, sufrirá un retardo y un cierto grado de dispersión al pasar por la columna. La dimensión de estos efectos dependerá de la naturaleza de la adsorción. La técnica cromatográfica se basa en el hecho de que diferentes solutos pueden sufrir diferentes retardos en un mismo adsorbente.

Caso 4 Un pulso inyectado a una columna donde exista adsorción y efectos de flujo no ideal simultáneamente, tendrá un tiempo de retención igual al del caso 3, pero una mayor dispersión.

Se han desarrollado varios modelos para predecir los perfiles de concentración de las columnas cromatográficas desde el punto cinético, los cuales presentan diferentes grados de complejidad y difieren entre sí en: a) el tipo de equilibrio que consideran, b) el número y tipo de resistencias a la transferencia de masa que toman en cuenta, c) la cinética en la superficie del adsorbente y d) los efectos de mezclado que incorporan.

Balances de masa en la columna La integración del modelo de la columna se inicia con el balance de masa de soluto en la fase líquida en una sección de la misma.

$$\frac{\partial c}{\partial t} - D_{ax}\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + v\frac{\partial c}{\partial z} = -\frac{R}{\varepsilon} \qquad (8.23)$$

donde:

ε: Fracción vacía del lecho. $[L^3/L^3]$.

c: Concentración de soluto en el líquido. $[M/L^3]$.

t: Tiempo. $[t]$.

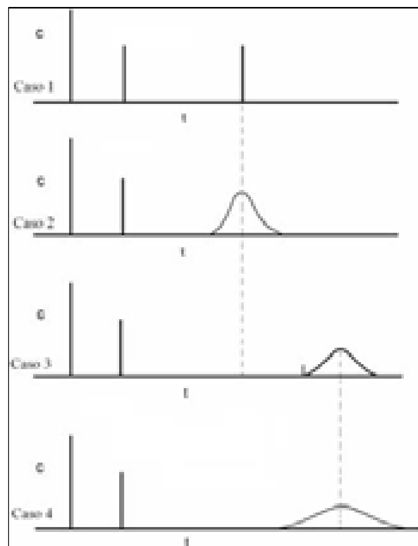


Figura 8.15: Descripción cualitativa del comportamiento de una columna.

D_{ax}: Coeficiente de dispersión axial. $[L^2/t]$.

z: Distancia axial. $[L]$.

v: Velocidad intersticial. $[L/t]$.

R: Velocidad de adsorción de soluto en el adsorbente. $[M/L^3 - t]$.

El balance de soluto sobre el adsorbente complementa al balance anterior y puede ser expresado como:

$$R = (1 - \varepsilon)\frac{\partial q}{\partial t} \tag{8.24}$$

A continuación se revisan dos modelos cinéticos de diferente grado de complejidad, el modelo cinético lineal y el modelo cinético de tres resistencias; ambos consideran relaciones de equilibrio lineales.

En este punto es importante recordar que los balances de masa y las relaciones de equilibrio para columnas cromatográficas son iguales que los de adsorción en columna, mientras que las condiciones iniciales son diferentes.

Modelo cinético lineal Este modelo supone que sólo una resistencias controla la transferencia de masa. En el caso que la resistencia en la película sea la controlante, la velocidad de transferencia de masa del líquido al adsorbente puede ser expresada como:

$$R = (1 - \varepsilon)k_L a(c - c^*) \tag{8.25}$$

donde c^* es una concentración hipotética en el líquido en equilibrio con la concentración de soluto en el adsorbente (en algunos casos la k_La se toma como un coeficiente que agrupa todas las resistencias, debido a la dificultad experimental de mediciones que puedan distinguir entre los diferentes mecanismos de control).

El modelo supone además que la dispersión axial y la acumulación en la fase líquida son despreciables, entonces la ecuación (8.23) se transforma en:

$$R = -\varepsilon v \frac{dc}{dz} \tag{8.26}$$

Combinando las ecuaciones (8.25) y (8.26) se obtiene:

$$(1-\varepsilon)k_La(c-c^*) = -\varepsilon v \frac{dc}{dz} \tag{8.27}$$

Esta ecuación puede ser integrada para obtener la longitud de la columna,

$$L = \int_0^L dz = \left[\frac{\varepsilon v}{(1-\varepsilon)k_La}\right] \left\{\int_c^{c_A} \frac{dc}{(c-c^*)}\right\} \tag{8.28}$$

al término entre paréntesis cuadrados de la ecuación anterior se le llama altura de una unidad de transferencia HTU (de sus siglas en inglés), y al término entre corchetes se le llama número de unidades de transferencia NTU (de sus siglas en inglés); de tal manera que la ecuación anterior puede ser expresada como:

$$L = HTU \cdot NTU \tag{8.29}$$

Los modelos cuando la resistencia controlante es otra son análogos.

Modelo de tres resistencias: Teoría de momentos El modelo cinético general para describir una columna cromatográfica es más complejo e incluye los efectos de: a) resistencia a la transferencia de masa en la película, b) resistencia a la difusión al interior de la partícula, c) adsorción reversible de primer orden sobre la superficie de los poros (isoterma lineal) y d) dispersión axial.

Estos efectos se integran mediante un modelo pseudocontinuo descrito por el sistema de ecuaciones que se lista a continuación.

1. Balance de soluto en el seno del líquido de la columna:

$$\frac{\partial c}{\partial t} - D_{ax}\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + v\frac{\partial c}{\partial z} = -\frac{R}{\varepsilon} \tag{8.30}$$

En la expresión anterior, R es la velocidad de transferencia de masa de soluto entre el líquido y el adsorbente por unidad de volumen de lecho, dada por:

$$R = \frac{3(1-\varepsilon)}{r_m}\varepsilon_i D_i \frac{\partial c_i}{\partial r}\Big|_{r=r_m} \tag{8.31}$$

donde:

ε: Porosidad del lecho.

D_i: Difusividad del soluto al interior del poro del adsorbente.

r: Distancia radial del centro de la partícula a un punto dado en la partícula de adsorbente.

r_m: Radio de la partícula.

c_i: Concentración de soluto en la fase líquida al interior del poro.

2. Balance de soluto al interior del poro:

$$\varepsilon_i \frac{\partial c_i}{\partial t} + (1 - \varepsilon_i) \frac{\partial q_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_i \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) \tag{8.32}$$

donde q_i es la concentración de soluto en el adsorbente y ε_i es la porosidad de la partícula de adsorbente al soluto de interés.

3. Balance de soluto interfacial en la superficie del adsorbente:

$$\varepsilon_i D_i \frac{\partial c_i}{\partial r}|_{r=r_m} = k_L (c - c_i)|_{r=r_m} \tag{8.33}$$

4. Adsorción reversible de primer orden en la superficie del adsorbente:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 \left(c_i - \frac{q_i}{K} \right) \tag{8.34}$$

donde k_1 es la constante cinética de la reacción de superficie en el sentido directo y K es la constante de equilibrio de la reacción de superficie.

Las condiciones iniciales y de frontera del sistema de ecuaciones anterior son:

en:	**para:**	**se tiene:**
$r = 0$	$t \geq 0$	$\partial c_i / \partial r = 0$
$z \geq 0$	$t = 0$	$c = 0$
$r \geq 0$	$t = 0$	$c_i = 0$
$z = 0$	$0 \leq t \leq t_p$	$c = c_A$
$z = 0$	$t > t_p$	$c = 0$

donde $t_p = V_p/F$ es la duración de un pulso rectangular de volumen V_p inyectado a la columna.

El sistema de ecuaciones (8.30)-(8.34) fue resuelto en el dominio de las Transformadas de Laplace (Furusawa *et al.*, 1976), pero la solución no pudo ser invertida para obtener la expresión de la concentración a la salida como una función del tiempo. La solución en el dominio de Laplace fue utilizada para calcular los momentos del perfil de concentración del soluto dados por las expresiones siguientes:

La ecuación para el momento n del perfil de concentración del soluto en un lecho de longitud L es,

$$m_n = \int_0^\infty c(t,L)t^n dt \tag{8.35}$$

de tal manera que el momento absoluto n es,

$$\mu_n = \frac{m_n}{m_o} = \frac{\int_0^\infty c(t,L)t^n dt}{\int_0^\infty c(t,L)dt} \tag{8.36}$$

y el momento central n,

$$\mu_n' = \frac{\int_0^\infty c(t,L)(t-\mu_1)^n dt}{\int_0^\infty c(t,L)dt} \tag{8.37}$$

Momentos de cromatogramas Dos momentos tienen un significado físico y son de particular interés en cromatografía:

1. El primer momento absoluto o tiempo de retención promedio dado por:

$$\mu_1 = \frac{\int_0^\infty c(t,L)tdt}{\int_0^\infty c(t,L)dt} \tag{8.38}$$

y de acuerdo al modelo está dado por,

$$\mu_1 = \left(\frac{L}{\varepsilon \upsilon}\right)\left[\varepsilon + (1-\varepsilon)\varepsilon_i(1+\frac{K}{\varepsilon_i})\right] + \frac{t_p}{2} \tag{8.39}$$

De acuerdo a la ecuación anterior, el tiempo de retención de un soluto en la columna depende del tiempo de residencia del eluyente, el tipo de empaque y de la constante de equilibrio.

Se puede utilizar la expresión del primer momento absoluto para estimar la porosidad de lechos cuando el soluto es tan grande que $\varepsilon_i = 0$ y no existe adsorción, de tal manera que la ecuación (8.39) se reduce a:

$$\mu_1 - \frac{t_p}{2} = \frac{L}{\upsilon}$$

2. El segundo momento central es una medida de la dispersión del pico y está dado por:

$$\mu_2^{'} = \frac{\int_0^\infty c(t,L)(t-\mu_1)^2 dt}{\int_0^\infty c(t,L)dt} \tag{8.40}$$

y de acuerdo al modelo general,

$$\mu_2^{'} = \frac{2L}{\varepsilon v}\left\{\frac{\varepsilon D_{ax}}{(\varepsilon v)^2}\left[\varepsilon + (1-\varepsilon)(\varepsilon_i)\left(1+\frac{K}{\varepsilon_i}\right)\right]^2 + (1-\varepsilon)\left[\left(\frac{K^2}{k_1}\right) + \left(\frac{d_p^2 \varepsilon_i^2}{60}\right)\left(1+\frac{K}{\varepsilon_i}\right)^2\left(\frac{1}{\varepsilon_i D_i} + \frac{10}{k_L d_p}\right)\right]\right\} + \frac{t_p^2}{12} \tag{8.41}$$

La ecuación anterior muestra que la dispersión del pico respecto al tiempo de elución o segundo momento central, es función de varios parámetros como el coeficiente de transferencia de masa en la película, el coeficiente de difusión efectiva al interior del poro, la constante cinética de adsorción, la constante de equilibrio, el coeficiente de dispersión y los parámetros del empaque.

El método de momentos elimina la necesidad de una solución numérica del sistema de ecuaciones de conservación de la columna. Sin embargo, su uso está restringido a sistemas que presenten isotermas y expresiones de transferencia de masa lineales.

Una de las principales aplicaciones del modelo es en la estimación de parámetros para diseño, pero sólo de aquellos que no varían con la escala, como la difusividad efectiva de partícula, las constantes cinéticas de adsorción y la porosidad de la partícula. Sin embargo, los coeficientes de dispersión que se determinen en una columna de laboratorio pueden ser muy diferentes a los de una columna industrial.

Ejemplo 8.4. Estimación de la porosidad de un adsorbente. Se midieron (Arnold *et al.,* 1985) los tiempos de retención promedio de mioglobulina y albúmina de suero de bovino (ASB), utilizando pulsos de 1.0 mL en una columna de 1.6 cm de diámetro, variando su longitud entre 26 y 31 cm. Los estudios se realizaron bajo condiciones de no-adsorción (columna equilibrada con solución amortiguadora de elución $K = 0$), utilizando Sefarosa CL-4B (100 μm).

Los resultados se correlacionaron con $L/\varepsilon v$ y se ajustaron a las rectas:

Para Mioglobulina:

$$\mu_1 - \frac{t_p}{2} = 0.87\frac{L}{\varepsilon v}$$

Para Albúmina:

$$\mu_1 - \frac{t_p}{2} = 0.69\frac{L}{\varepsilon v}$$

La porosidad de la columna se estimó utilizando datos de tiempo de residencia de azul de dextrano (molécula que no penetra en los poros del adsorbente ni se adsorbe) y fue de $\varepsilon = 0.35$.

Se pide: A partir de estos resultados estimar la porosidad del empaque ε_i.

Solución:

En el caso que no existe adsorción ($K = 0$), la ecuación (8.39) se puede expresar como:

$$\mu_1 = \frac{L}{\varepsilon v}\left[\varepsilon + (1-\varepsilon)\varepsilon_i\right] + \frac{t_p}{2}$$

entonces,

$$\mu_1 - \frac{t_p}{2} = \frac{L}{\varepsilon v}\left[\varepsilon + (1-\varepsilon)\varepsilon_i\right]$$

sustituyendo valores en la expresión anterior para el caso de la mioglobulina se tiene:

$$\begin{aligned} 0.87 &= 0.35 + (1-0.35)\varepsilon_i \\ \varepsilon_i &= 0.8 \end{aligned}$$

sustituyendo valores para el caso de la albúmina se tiene:

$$\begin{aligned} 0.69 &= 0.35 + (1-0.35)\varepsilon_i \\ \varepsilon_i &= 0.52 \end{aligned}$$

El adsorbente presenta diferente porosidad dependiendo del tamaño del soluto: ASB (PM = 67,000) y Mioglobulina (PM = 17,500).

Teoría de platos y teoría cinética

La teoría de platos es sencilla en su desarrollo matemático, pero no puede ser usada para predecir el comportamiento de columnas a partir de datos fundamentales. Se han efectuado diferentes intentos para superar esta limitación de la teoría de platos, todos los desarrollos efectuados han producido expresiones en las que la $HETP$ (medida del grado de dispersión del pico) se relaciona con parámetros que permiten predecir el comportamiento de la columna. Sobre este tipo de enfoque dos tipos de modelos resultan de particular interés: el modelo lineal y el modelo de van Deemter.

Modelo lineal Una primera aproximación para la obtención de expresiones de $HETP$ en función de variables de operación de la columna, es igualar el número de platos teóricos de la teoría de platos (N) con el número de unidades de transferencia (NTU) del modelo cinético lineal, considerando que ambos modelos describen un comportamiento gaussiano similar, de tal manera que de acuerdo a las ecuaciones (8.28) y (8.29):

$$N = NTU = \frac{(1-\varepsilon)k_L aL}{\varepsilon \upsilon} \tag{8.42}$$

y combinando esta ecuación con la ecuación (8.17) se puede obtener el perfil de concentración en función de las variables de operación,

$$c = c_o \exp\left[-\frac{(1-\varepsilon)k_L aL}{2\varepsilon \upsilon}\left(\frac{t}{t_o}-1\right)^2\right] \tag{8.43}$$

En la ecuación (8.43) la desviación estándar del pico está dada por:

$$\sigma = t_o\left(\frac{\varepsilon \upsilon}{(1-\varepsilon)k_L aL}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{8.44}$$

por otro lado se sabe que:

$$HETP = \frac{L}{N} \tag{8.45}$$

y se puede expresar la $HETP$ no sólo en términos de un parámetro hipotético N, sino en función de características físicas del sistema,

$$HETP = \frac{\varepsilon \upsilon}{(1-\varepsilon)k_L a} = \frac{\sigma^2 L}{t_o^2} \tag{8.46}$$

Ejemplo 8.5. Cromatografía de aspartamo. La cromatografía del aminoácido d-aspartamo (Belter *et al.,* 1988) en sílica gel modificada, con silanos como brazos espaciadores y l-prolina como ligando, produce un cromatograma en el cual el tiempo de elución del d-aspartamo es $t_o = 62$ min y la desviación estándar $\sigma = 3$ min, cuando se utiliza una columna de 25 cm de longitud y 0.41 cm de diámetro, rellena de partículas esféricas de 0.0045 cm de diámetro. La fracción vacía de la columna se estimó en $\varepsilon = 0.38$ y el flujo utilizado fue de 2.0 cm^3/min.

La cinética de adsorción puede suponerse que es controlada por el coeficiente de transferencia de masa de la película, el cual puede ser estimado por medio de la siguiente correlación:

$$k_L = 1.17\varepsilon \upsilon \left(\frac{d_p \varepsilon \upsilon \rho_L}{\mu_L}\right)^{-0.42}\left(\frac{\mu_L}{\rho_L D_{AB}}\right)^{-0.67}$$

La difusividad del d-aspartamo en estas condiciones es $D_{AB} = 0.7 \times 10^{-5}$ cm^2/s. La viscosidad y densidad pueden ser tomadas como las del agua.

Se pide calcular:

a) La constante de equilibrio del sistema, K.

b) N y $HETP$ de acuerdo al modelo de platos.

c) N, σ^2 y $HETP$ de acuerdo al modelo lineal combinado.

d) El efecto de variaciones de $\pm 20\,\%$ de la longitud de la columna, sobre N y t_o.

Solución:

a) Cálculo de la constante de equilibrio.

Se puede utilizar la ecuación (8.16) para obtener K, para lo cual es necesario calcular primero el volumen del lecho V_c:

$$V_c = \frac{\pi \times (0.41 \text{ cm})^2}{4} \times 25 \text{ cm} = 3.30 \text{ cm}^3$$

rearreglando la ecuación (8.16) y sustituyendo valores se tiene:

$$K = \frac{1}{(1-\varepsilon)} \left(\frac{t_o F}{V_c} - \varepsilon \right) = \frac{1}{(1-0.38)} \left(\frac{62 \text{ min} \times 2 \ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{min}}}{3.30 \text{ cm}^3} - 0.38 \right) = 60$$

b) Cálculo de N y $HETP$ con el modelo de platos.

De acuerdo con las ecuaciones (8.45) y (8.46),

$$N = \frac{t_o^2}{\sigma^2} = \frac{62^2 \text{ min}^2}{3^2 \text{ min}^2} = 427$$

por la definición de $HETP$ dada en la ecuación (8.45),

$$HETP = \frac{L}{N} = \frac{25 \text{ cm}}{427} = 0.0585 \text{ cm}$$

c) Cálculo N, σ^2 y $HETP$ con el modelo combinado lineal.

Para calcular N se utiliza la ecuación (8.42). Para tal efecto primero se calcula la velocidad superficial $\varepsilon \upsilon$,

$$\varepsilon \upsilon = \frac{2 \ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{min}} \times \dfrac{\text{min}}{60 \text{ s}}}{0.132 \text{ cm}^2} = 0.25 \ \frac{\text{cm}}{\text{s}}$$

El coeficiente de transferencia de masa se calcula utilizando la correlación dada de tal manera que:

$$k_L = 1.17 \times 0.25\ \frac{\text{cm}}{\text{s}} \times \left(\frac{0.0045\ \text{cm} \times 0.25\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}} \times 1.0\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3}}{0.01\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}-\text{s}}} \right)^{-0.42} \times \left(\frac{0.01\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}-\text{s}}}{1.0\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 0.7 \times 10^{-5}\ \dfrac{\text{cm}^2}{\text{s}}} \right)^{-0.67}$$

$$k_L = 5.67 \times 10^{-3}\ \frac{\text{cm}}{\text{s}}$$

El cálculo del área interfacial es:

$$a = \frac{6}{d_p} = \frac{6}{0.0045\ \text{cm}} = 1333.33\ \text{cm}^{-1}$$

entonces,

$$N = \frac{(1-\varepsilon)k_L a L}{\varepsilon \upsilon} = \frac{5.67 \times 10^{-3}\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}} \times 826.67\ \text{cm}^{-1} \times 25\ \text{cm}}{0.25\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}}} = 468$$

De acuerdo a la ecuación (8.46),

$$\sigma = t_o \left(\frac{\varepsilon \upsilon}{(1-\varepsilon)k_L a L} \right)^{\frac{1}{2}} = \frac{62\ \text{min}}{\sqrt{468}} = 2.86\ \text{min}$$

De la ecuación (8.46),

$$HETP = \frac{\sigma^2 L}{t_o^2} = \frac{(2.86\ \text{min})^2 \times 25\ \text{cm}}{(63\ \text{min})^2} = 0.052\ \text{cm}$$

d) Para resolver este inciso necesariamente se tiene que hacer uso del modelo combinado lineal. Esta es la ventaja de este tipo de modelo; es decir, nos permite hacer predicciones con la variación de ciertos parámetros.

Una columna de 20 cm representa la reducción de un 20 % en longitud de tal manera que:

$$N = \frac{5.67 \times 10^{-3}\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}} \times 826.67\ \text{cm}^{-1} \times 20\ \text{cm}}{0.25\ \dfrac{\text{cm}}{\text{s}}} = 374$$

por otra parte:

$$t_o = [0.38 + (1-0.38)\ \times 60] \times \frac{0.132\ \text{cm}^2 \times 20\ \text{cm}}{2\ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{min}}} = 49.6\ \text{min}$$

De la misma manera se pueden efectuar los cálculos para $L = 30$ cm (+20 %).

Modelo de van Deemter El modelo de van Deemter (van Deemter *et al.,* 1956) es uno de los más conocidos para cromatografía por elución. Estos autores combinaron los resultados de la teoría de platos con los del modelo cinético de Lapidus y Amundson (Lapidus y Amundson, 1952). Este último fue utilizado en forma simplificada para el caso de un sistema con isoterma de adsorción lineal y una columna larga, de tal manera que el perfil de concentración del soluto a la salida de la columna también sea gaussiano como el de la teoría de platos. El resultado fue obtener una expresión para $HETP$ en función de los parámetros considerados por Lapidus y Amundson para su modelo cinético. Dado que el modelo de Lapidus y Amundson incluye los efectos de dispersión axial (difusión molecular y mezclado), resistencia a la transferencia de masa en la película y al interior del poro, la expresión de van Deemter considera todos estos efectos en tiempo real.

Una forma (Arnold *et al.,* 1985) de la expresión de van Deemter es:

$$HETP = 2\ell + \frac{2\eta D_{AB}}{\varepsilon v} + 2\left[(1-\varepsilon)(\varepsilon_i)\left(1+\frac{K}{\varepsilon_i}\right)\right]^2 \left\{\frac{\left(\frac{d_p^2}{60(1-\varepsilon)}\right)\left(\frac{1}{\varepsilon_i D_i}+\frac{10}{k_L d_p}\right)}{\left[\varepsilon+(1-\varepsilon)(\varepsilon_i)\left(1+\frac{K}{\varepsilon_i}\right)\right]^2}\right\}(\varepsilon v) \tag{8.47}$$

donde:

ℓ: Longitud de mezclado. $[L]$.

D_{AB}: Coeficiente de difusión del soluto. $[L^2/t]$.

η: Tortuosidad del lecho.

En la expresión anterior el coeficiente de dispersión axial εD_{ax} se considera que está conformado por dos contribuciones: la difusión molecular en la dirección axial y un término de mezclado que es proporcional a la velocidad, esto es,

$$\varepsilon D_{ax} = \eta D_{AB} + \ell \varepsilon v \tag{8.48}$$

En el caso de cromatografía líquida de moléculas de tamaño grande (por ejemplo proteínas), el segundo término del lado derecho de la ecuación (8.47) puede ser despreciado.

Ejemplo 8.6. Comparación de los resultados de la teoría de momentos con el modelo de van Deemter. En un determinado proceso cromatográfico se puede suponer que existe equilibrio sobre la superficie del adsorbente (sólo existen las resistencias de la película y del poro) y que el pulso alimentado es de duración corta.

Se pide: Demostrar que para el caso de perfiles de concentración gaussianos la teoría de momentos y la de van Deemter producen resultados idénticos.

Solución:

En el caso de perfiles gaussianos se cumple que:

$$\mu_1 = t_o$$

y

$$\mu_2^{'} = \sigma^2$$

de tal manera que:

$$HETP = \frac{\mu_2^{'} L}{\mu_1^2}$$

La expresión anterior conjuntamente con las ecuaciones (8.39), (8.41), (8.48) y las condiciones particulares:

$$\begin{aligned} t_p &= 0 \\ \frac{K^2}{k_1} &= 0 \end{aligned}$$

conducen a:

$$(HETP)_{\text{momentos}} = (HETP)_{\text{van Deemter}}$$

Ecuación de van Deemter simplificada La ecuación de van Deemter (8.47) en su versión más popular y simplificada se escribe como:

$$HETP = A + \frac{B}{(\varepsilon v)} + C(\varepsilon v) \tag{8.49}$$

donde:

El término A es función del tamaño y uniformidad del adsorbente de la columna, ya que esto determina la longitud y uniformidad del mezclado. Las partículas de diámetro pequeño, producen valores bajos de A.

El término B se relaciona con la difusión molecular axial. Este término puede ser despreciado en el caso de cromatografía líquida y particularmente cuando el soluto es una molécula grande como una proteína.

Si la velocidad superficial en una columna disminuye, el término $B/(\varepsilon v)$ aumenta, esto significa que al ser mayor el tiempo de retención hay más tiempo para que el pulso se disperse por difusión molecular. Consecuentemente la contribución de este término tiende a disminuir la eficiencia de la columna; es decir, a incrementar el $HETP$.

El término C representa la dispersión del pulso debida a la resistencia a la transferencia de masa. Este término es función de la geometría de la fase estacionaria, del coeficiente de distribución del soluto y de las velocidades de transferencia. Si la velocidad superficial se incrementa, el término $C\varepsilon v$ se incrementa. Esto significa que a mayor velocidad superficial en la columna, el tiempo para lograr el equilibrio es menor. Consecuentemente la contribución de este término tiende a disminuir la eficiencia de la columna.

En la Figura 8.16 se muestra el efecto de la velocidad superficial en la columna sobre el $HETP$, de acuerdo al modelo de van Deemter. Se observa que existe una velocidad óptima debido a los efectos opuestos de los términos $B/(\varepsilon v)$ y $C(\varepsilon v)$.

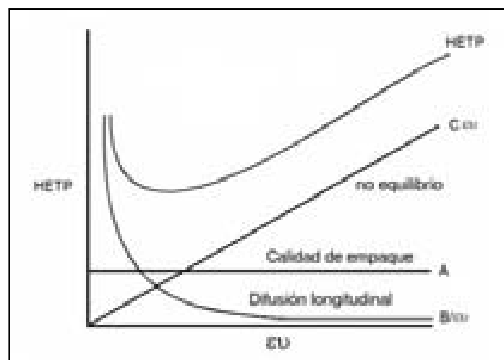


Figura 8.16: Efecto de la velocidad superficial sobre HETP. Fuente: Janson y Hedman, 1982.

Para una columna particular es posible determinar las constantes de la ecuación de van Deemter efectuando mediciones de $HETP$ a tres velocidades diferentes.

8.4.3. Evaluación del Comportamiento de las Columnas: Resolución, Pureza y Rendimiento

Los objetivos de un proceso cromatográfico a escala pueden ser una alta purificación de un componente o una alta productividad. Cuando el rendimiento de una operación disminuye conforme la pureza deseada aumenta, estos objetivos no pueden lograrse simultáneamente. La teoría cromatográfica permite evaluar el comportamiento de una operación mediante el uso de tres criterios: a) resolución, b) pureza y c) rendimiento.

Resolución

En la cromatografía por elución un objetivo puede ser el separar los componentes de una muestra en forma satisfactoria. La medida del grado de separación de dos componentes en una operación cromatográfica se conoce como resolución o eficiencia de separación.

La resolución de una columna depende de dos factores: a) la selectividad de la columna que es una medida de la afinidad de los solutos por el adsorbente dada por el factor de separación o selectividad $\alpha = K_2/K_1$ y b) la eficiencia de la columna que está relacionada con el grado de dispersión de los picos ($HETP$). La separación de dos solutos (Fig. 8.17a) puede aumentarse mejorando el factor de separación (Fig. 8.17b), aumentando el número de platos (Fig. 8.17c) o combinando ambos efectos.

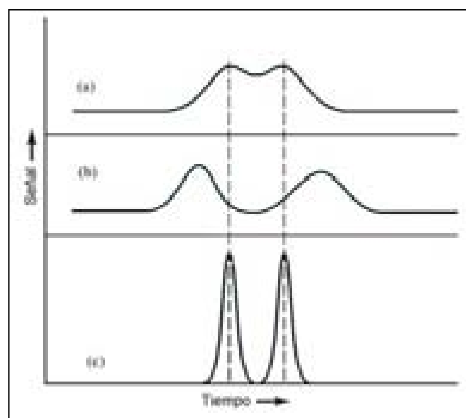


Figura 8.17: Efecto de la selectividad y la eficiencia sobre la resolución. a) Factor de separación pobre y número de platos bajo, b) Factor de separación bueno y número de platos bajo y c) Factor de separación pobre y número de platos grande.

Si se considera la Figura 8.18 una separación completa de dos picos puede lograrse cuando las rectas que definen la amplitud de la base de los picos W, se intersectan abajo del eje t. Puede ser demostrado que cuando esto sucede:

$$Rs = \frac{2(t_{o2} - t_{o1})}{W_1 + W_2} \geq 2 \tag{8.50}$$

y

$$W = 4\sigma \tag{8.51}$$

donde Rs es la resolución. Generalmente cuando $Rs \geq 1.5$ la separación es satisfactoria.

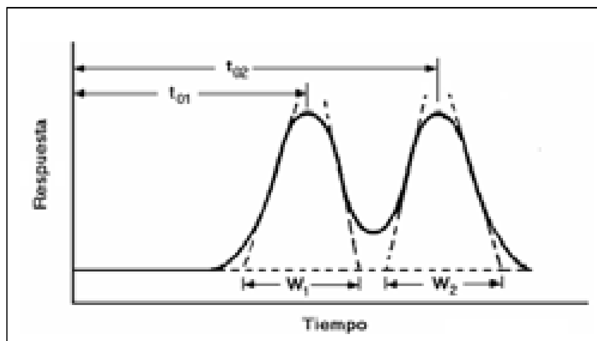


Figura 8.18: Esquema para el cálculo de la resolución en una columna cromatográfica.

Una resolución adecuada puede ser difícil de obtener cuando se trata de resolver una mezcla de componentes con propiedades similares, como en la separación de mezclas de proteínas. En este caso la mejor forma para mejorar la resolución depende del tipo de cromatografía, pero existen algunas líneas generales como las siguientes:

1. Para incrementar $\Delta t = (t_{o2} - t_{o1})$.

   a) Incrementar la longitud de la columna L.

   b) Aumentar la cantidad de la fase estacionaria.

   c) Mejorar la selectividad, seleccionando otra fase estacionaria u otra fase móvil.

2. Para disminuir el ancho de los picos.

   a) Empacar más uniformemente la columna y/o disminuir el tamaño de las partículas del empaque.

   b) Optimizar el flujo.

   c) Reducir el tamaño de la muestra.

La ecuación (8.50) puede ser utilizada conjuntamente con los modelos cromatográficos apropiados para analizar este tipo de acciones y generar las decisiones correspondientes. Por ejemplo, se puede estimar la longitud necesaria de una columna para alcanzar una determinada resolución.

Ejemplo 8.7. Cálculo de la resolución de una columna. En una columna de filtración en gel en la que se separa un anticuerpo de una impureza se determinan los siguientes parámetros:

	Anticuerpo	**Impureza**
t_o (h)	6.42	7.600
σ (h)	0.80	0.175
c_o	82	43

Se pide: Calcular la resolución lograda.

Solución:

Se puede calcular el ancho de las bases de los picos W utilizando la ecuación (8.51),

$$W_1 = 4\sigma_1 = (4)(0.80 \text{ h}) = 3.2 \text{ h}$$

$$W_2 = 4\sigma_2 = (4)(0.175 \text{ h}) = 0.7 \text{ h}$$

la resolución se calcula con la ecuación (8.50),

$$Rs = \frac{(7.60 - 6.42)}{3.2 + 0.70} = 0.3$$

esta resolución es muy baja.

Pureza

Cuando se tiene una resolución muy baja debido a propiedades muy semejantes entre los solutos de una mezcla o por cuestiones de productividad, existe un compromiso entre el rendimiento alcanzable y la pureza deseada. Entre mayor sea la pureza requerida, menor rendimiento puede ser obtenido.

Es posible efectuar un análisis de pureza y rendimiento de columnas empleando los modelos revisados (Azevedo *et al.*, 2009). Considerando que en una operación cromatográfica la masa eluida del soluto j de una mezcla, en el intervalo de $t^{'}$ a t está dada por:

$$SE_j = \int_{t'}^{t} F c_j dt \tag{8.52}$$

donde:

SE_j: Masa del soluto j eluida en el intervalo de tiempo.

F: Flujo de solvente en la columna.

c_j: Concentración del soluto j a la salida de la columna.

La pureza del soluto j, PR_j, se define como la razón de la masa de soluto j obtenida en el intervalo de $t^{'}$ a t, entre la masa total obtenida en ese mismo intervalo, es decir:

$$PR_j = \frac{\int_{t'}^{t} Fc_j dt}{\sum_{i=1}^{n} \int_{t'}^{t} Fc_i dt} \tag{8.53}$$

donde n es el número de solutos presentes.

Rendimiento

El rendimiento de una operación cromatográfica puede ser definido como la cantidad de soluto recuperado en un cierto intervalo, respecto a la cantidad aplicada en la muestra original.

La masa total de soluto j inyectada a la columna está dada por:

$$ST_j = \int_{0}^{\infty} Fc_j dt \tag{8.54}$$

La proporción de soluto j recuperada en el intervalo de t' a t o rendimiento RE_j puede entonces expresarse como:

$$RE_j = \frac{SE_j}{ST_j} = \frac{\int_{t'}^{t} Fc_j dt}{\int_{0}^{\infty} Fc_j dt} \tag{8.55}$$

Las ecuaciones (8.53) y (8.55) combinadas con los modelos que describen los perfiles de concentración en las columnas, nos permiten calcular y/o predecir (según el tipo de modelo) rendimientos y pureza en columnas.

Ejemplo 8.8. Pureza y Rendimiento. La Figura 8.19 muestra los perfiles de concentración del anticuerpo y la impureza del Ejemplo 8.7. Puede observarse un traslape de los picos de estas sustancias debido a la baja resolución de la operación.

Se pide: Describir la variación de la pureza y el rendimiento del anticuerpo con el tiempo de operación, si la masa de anticuerpo y la masa de impureza alimentadas a la columna son de 1.63 g y 0.45 g, respectivamente (se usa el subíndice 1 para el anticuerpo y el subíndice 2 para la impureza).

Solución:

Combinando las ecuaciones (8.17) y (8.55) se obtiene una expresión para el rendimiento en función del tiempo,

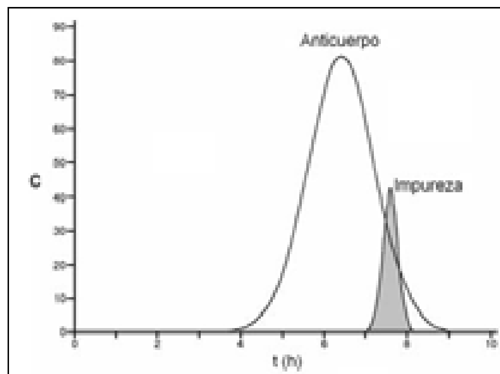


Figura 8.19: Perfiles de concentración del Ejemplo 8.8.

$$RE_1 = \frac{SE_1}{ST_1} = \frac{\int\limits_{t'}^{t} Fc_{o1} \exp\left[-\frac{(t-t_{01})^2}{2\sigma_1^2}\right] dt}{\int\limits_{0}^{\infty} Fc_{o1} \exp\left[-\frac{(t-t_{o1})^2}{2\sigma_1^2}\right] dt}$$

La expresión anterior puede integrarse expresando la integral del numerador como una diferencia de integrales y utilizando la definición de la función error, obteniéndose:

$$RE_1 = \frac{1}{2}\left[Erf\left(\frac{t-t_{o1}}{\sqrt{2}\sigma_1}\right) - Erf\left(\frac{t^{'}-t_{o1}}{\sqrt{2}\sigma_1}\right)\right]$$

cuando $t^{'} = 0$ la expresión anterior puede aproximarse a:

$$RE_1 = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t-t_{o1}}{\sqrt{2}\sigma_1}\right)\right]$$

La variación de la pureza con el tiempo de operación se obtiene combinando las ecuaciones (8.17) y (8.53),

$$PR_1 \frac{\int\limits_{t'}^{t} Fc_{o1} \exp\left[-\frac{(t-t_{o1})^2}{2\sigma_1^2}\right] dt}{\int\limits_{t'}^{t} Fc_{o1} \exp\left[-\frac{(t-t_{o1})^2}{2\sigma_1^2}\right] dt + \int\limits_{t'}^{t} Fc_{o2} \exp\left[-\frac{(t-t_{o2})^2}{2\sigma_2^2}\right] dt}$$

utilizando la definición de función error la expresión anterior puede expresarse como:

$$PR_1 = \frac{(c_{o1})\, RE_1}{(c_{o1})\, RE_1 + (c_{o2})\, RE_2}$$

sustituyendo valores en las expresiones desarrolladas se tiene:

$$\begin{aligned} RE_1 &= \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t - 6.42}{\sqrt{2}(0.8)}\right)\right] \\ RE_2 &= \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t - 7.60}{\sqrt{2}(0.175)}\right)\right] \\ PR_1 &= \frac{82\ RE_1}{82\ RE_1 + 43\ RE_2} \end{aligned}$$

Los resultados sobre los cálculos de los rendimientos y la pureza de anticuerpo se muestran en forma gráfica en la Figura 8.20. Se puede constatar en la figura el hecho de que en una operación de separación generalmente se pueden obtener altas purezas o altos rendimientos, pero no ambos.

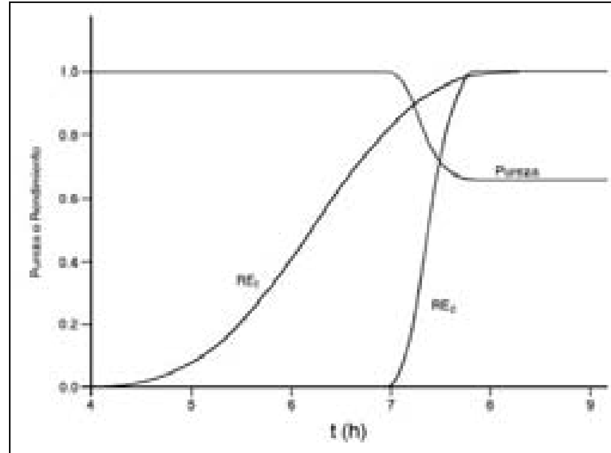


Figura 8.20: Perfiles de pureza y rendimiento del Ejemplo 8.8.

8.4.4. Escalamiento y Optimización

El mercado del producto o el interés social del mismo son los elementos principales a considerar en el escalamiento de un proceso. En el caso de productos novedosos de alto precio o alto interés social y de bajo volumen de producción, el escalamiento del proceso se hace de manera expedita, tanto técnicamente como desde el punto de vista regulatorio (oferta al mercado y el tiempo controlan).

Por otro lado, para productos de alto volumen o que van a competir con productos existentes, el diseño del proceso debe ser más cuidadoso (la oferta excede la demanda y el costo controla).

El escalamiento de una columna cromatográfica consiste generalmente en determinar el diseño de la columna que permita cumplir con una productividad mayor a la de la columna empleada en la obtención de los datos para el diseño. En general las técnicas de escalamiento surgen del reconocimiento de la imposibilidad del diseño de este tipo de equipo mediante modelos estrictamente teóricos (Gibbs y Lighfoot, 1986).

Factores de escalamiento

Son varios los factores a considerar en el escalamiento de columnas cromatográficas dentro de los cuales se pueden destacar los siguientes.

1. Objetivo del escalamiento. Generalmente el objetivo de un escalamiento es incrementar la productividad. En algunos casos sólo se busca incrementar la producción.

2. Criterio de escalamiento. Existen varias alternativas no excluyentes que pueden servir de base para realizar el estudio de escalamiento como incrementar: a) el flujo volumétrico a procesar, b) la concentración de la muestra y c) el volumen de la muestra.

El incrementar sólo el flujo volumétrico, manteniendo la concentración y el tamaño relativo de la muestra, permite conservar la linearidad del proceso.

Cuando se incrementa la concentración y/o el volumen de la muestra se produce una condición de sobrecarga, que produce un perfil de concentración no gaussiano a la salida de la columna (Fig. 8.9). En el caso de muestras más concentradas generalmente se producen isotermas no lineales y efectos de interferencia de los solutos en la adsorción, que se traducen en una disminución del grado de purificación obtenible. En estos casos no puede ser aplicado el concepto de $HETP$ desarrollado para sistemas lineales.

3. Restricciones. El escalamiento además de cumplir con el objetivo fundamental de incrementar la productividad (o al menos la producción), debe también cumplir con las restricciones del proceso en cuanto a pureza, rendimiento, concentración del producto y duración de cada ciclo.

4. Características de flujo. El escalamiento de columnas presenta varios problemas asociados al flujo dentro del lecho.

a) El incremento de la longitud de la columna es imposible sin reducir la velocidad de percolación debido a que generalmente las caídas de presión de las columnas de laboratorio están en el límite del colapso de los adsorbentes empleados.

b) El incremento del diámetro produce problemas de distribución del flujo y de incremento del gradiante de presión por disminución de soporte por la pared.

La caída de presión en una columna empacada en régimen laminar está dada

por la ecuación de Blake-Kozeny (Bird *et al.,* 1960),

$$\Delta P = \frac{150\mu(1-\varepsilon)\upsilon L}{\varepsilon^2 d_p^2} \tag{8.56}$$

donde υ es la velocidad intersticial y está dada por la relación:

$$\upsilon = \frac{4F}{\varepsilon \pi D_c^2} \tag{8.57}$$

donde D_c es el diámetro de la columna.

5. Geometría. Los parámetros básicos que define la geometría de una columna y que pueden ser modificados son: d_p, D_c y L.

6. Dinámica de la columna. En el proceso de escalamiento es fundamental tomar en cuenta los grupos adimensionales que se derivan de la expresiones diferenciales que describen los perfiles de concentración en la columna; de particular importancia son el tiempo t/t_o y el número de unidades de transferencia NTU o de etapas teóricas N.

7. Optimización. En el proceso de escalamiento generalmente también se busca optimizar la columna fijando criterios de máxima productividad o mínimo costo.

Métodos de escalamiento de columnas cromatográficas

Es importante distinguir dos métodos de escalamiento comúnmente empleados en cromatografía: a) escalamiento directo y b) escalamiento utilizando modelos.

Escalamiento Directo La mayoría de los procesos cromatográficos han sido escalados directamente de los sistemas analíticos de laboratorio (Wang, 1990). En el método de escalamiento directo se parte de un diseño óptimo desarrollado generalmente a nivel laboratorio y se supone que los fenómenos difusionales no varían dentro del rango de escalas que se estudia. Este método permite determinar el tamaño y las condiciones de operación de la escala nueva en forma rápida. Una limitación de este método es la escasa información que genera sobre los mecanismos cinéticos controlantes. A continuación se presenta un caso particular de escalamiento directo con el propósito de ejemplificar este método.

Caso de escalamiento directo de un sistema lineal Uno de los enfoques más utilizados en el escalamiento de columnas cromatográficas, consiste en seleccionar como parámetro de escalamiento un incremento del flujo de la columna, lo que permite mantener la linearidad del proceso. Generalmente las restricciones son de igual pureza y rendimiento en ambas escalas (Cowan *et al.,* 1987).

Estas restricciones requieren que la dinámica de la columna no cambie. El perfil de concentración de los solutos a la salida de la columna debe mantenerse

igual en ambas escalas. En este caso lineal los perfiles gaussianos están dados por la relación ya conocida,

$$c = c_o \exp\left[-\frac{\left(\frac{t}{t_o}-1\right)^2}{\frac{2}{N}}\right]$$

mantener los perfiles iguales durante el escalamiento, requiere mantener iguales c_o, N y t/t_o, para cada uno de los solutos en ambas escalas (escalas I y II).

Si el escalamiento es sólo a través del incremento de flujo, la concentración máxima de soluto, la cual es función de la concentración de entrada principalmente, puede considerarse igual en ambas escalas, o sea $c_{o_I} = c_{o_{II}}$, donde los subíndices I y II se refieren a cada una de las escalas.

El número de etapas cuando sólo un mecanismo controla la rapidez de la adsorción puede ser expresado como:

$$N = \frac{L}{k\,(\varepsilon v)^n\, d_p^{n+1}} \tag{8.58}$$

Asimismo, el tiempo de retención está dado por:

$$t_o = [\varepsilon + (1-\varepsilon)K]\,\frac{L}{\varepsilon v} \tag{8.59}$$

Como primer alternativa se puede considerar incrementar D_c, d_p y L; sin embargo, no es posible hacer este cambio sin alterar el perfil de concentración dado que el valor de N cambia con todos estos parámetros, independientemente del valor que tome n en la ecuación (8.58) o mecanismo controlante de la cinética.

También se puede considerar incrementar D_c y d_p, de tal manera que su razón se mantenga constante; sin embargo esto también conduce a un cambio en el valor de N.

Como tercera alternativa se puede considerar mantener d_p igual para ambas escalas e incrementar εv y L, de tal manera que la relación $L/\varepsilon v$ sea igual en ambas escalas, lo que permite mantener t_o y N constantes entre las escalas, en casi todos los casos de un sólo mecanismo controlante. Sin embargo, incrementar simultáneamente L y εv produce un efecto dramático sobre la caída de presión, de acuerdo a lo que establece la ecuación (8.56).

La solución comúnmente empleada consiste en usar columnas poco esbeltas con d_p , L y εv iguales a las de la columna de escala laboratorio. Esto permite aumentar la producción (no la productividad), al aumentar el área de flujo o diámetro de columna.

En el caso de que en el proceso de escalamiento pudiera disminuirse el diámetro del empaque utilizado a nivel laboratorio d_p, es posible realizar el escalamiento y obtener una mejor resolución, con una columna de menor volumen y conservando la misma caída de presión (Wankat y Koo, 1988).

Para reducir los costos asociados a la inversión inicial en las columnas, es preferible utilizar cada columna en varios ciclos procesando alícuotas del material inicial, entonces el problema de optimización de la columna escalada se traduce en encontrar el diámetro de columna que produce el menor costo del producto. De tal manera que el proceso de escalamiento y el de optimización, se desarrollan simultáneamente (Janson y Hedman, 1987).

Ejemplo 8.9. Optimización de una columna. Con el propósito de separar una proteína de sus sales acompañantes, se utiliza una columna cromatográfica de 5 cm de diámetro y 15 cm de longitud, empacada con sefacril S-200 superfino (dextrano). La alimentación consiste en una solución diluida que contiene una mezcla de solutos, 80 % de la cual es transferrina y 20 % sales (como NaCl). Cuando la columna se opera a $\varepsilon v = 10$ cm/h se produce una separación caracterizada de la siguiente manera (Janson y Hedman, 1982):

	Transferrina	**Sales**
t_o (min)	41	88
σ (min)	4	4

Se pide:

a) Calcular el tiempo necesario para obtener el 90 % de rendimiento de transferrina.

b) Si se desea incrementar la productividad de la columna manteniendo la misma geometría y suponiendo que la etapa controlante es tal que la desviación estándar es proporcional a $(\varepsilon v)^{-\frac{1}{2}}$, calcular la velocidad de alimentación máxima y el tiempo del ciclo necesario para obtener un rendimiento de 99 % de transferrina con 98 % de pureza (transferrina = 1 y sales = 2; escalas I y II).

Solución:

a) De acuerdo a la ecuación desarrollada en el Ejemplo 8.8,

$$RE_1 = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t - t_{o1}}{\sqrt{2}\sigma_1}\right)\right]$$

sustituyendo valores,

$$0.90 = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t - 41}{\sqrt{2} \times 4}\right)\right]$$

de tal manera que,

$$t_{90\,\%} = 46.1 \text{ min}$$

b) De acuerdo a las expresiones también desarrolladas en el Ejemplo 8.8, la pureza de la transferrina en la masa total colectada en un intervalo de tiempo está dada por:

$$PR_1 = \frac{\text{masa de transferrina}}{\text{masa total}}$$
$$PR_1 = \frac{(\text{masa de transferrina})(RE_1)}{(\text{masa de transferrina})(RE_1) + (\text{masa de sal})(RE_2)}$$

Por otro lado, como $\sigma \propto (\varepsilon \upsilon)^{-\frac{1}{2}}$, se pueden desarrollar la siguientes relaciones:

$$\left(\frac{\sigma_{II}}{\sigma_I}\right)_1 = \left(\frac{\varepsilon \upsilon_I}{\varepsilon \upsilon_{II}}\right)^{\frac{1}{2}}$$
$$\left(\frac{\sigma_{II}}{\sigma_I}\right)_2 = \left(\frac{\varepsilon \upsilon_I}{\varepsilon \upsilon_{II}}\right)^{\frac{1}{2}}$$

utilizando la ecuación (8.59), se obtiene:

$$\left(\frac{t_{o_{II}}}{t_{o_I}}\right)_1 = \frac{\varepsilon \upsilon_I}{\varepsilon \upsilon_{II}}$$
$$\left(\frac{t_{o_{II}}}{t_{o_I}}\right)_2 = \frac{\varepsilon \upsilon_I}{\varepsilon \upsilon_{II}}$$

Sustituyendo valores se puede establecer el siguiente sistema de ecuaciones:

$$0.98 = \frac{(0.8)\,(RE_{II})_1}{(0.8)\,(RE_{II})_1 + (0.2)\,(RE_{II})_2}$$
$$0.99 = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t - t_{o_{II}}}{\sqrt{2}\ \sigma_{II}}\right)_1\right]$$
$$(RE_{II})_2 = \frac{1}{2}\left[1 + Erf\left(\frac{t - t_{o_{II}}}{\sqrt{2}\ \sigma_{II}}\right)_2\right]$$
$$(\sigma_{II})_1 = \frac{12.65}{(\varepsilon \upsilon_{II})^{\frac{1}{2}}}$$
$$(\sigma_{II})_2 = \frac{12.65}{(\varepsilon \upsilon_{II})^{\frac{1}{2}}}$$
$$(t_{o_{II}})_1 = \frac{410}{\varepsilon \upsilon_{II}}$$
$$(t_{o_{II}})_2 = \frac{880}{\varepsilon \upsilon_{II}}$$

El sistema anterior de ecuaciones puede ser resuelto mediante el siguiente método de cálculo:

1. Suponer una $\varepsilon \upsilon_{II}$.

2. Calcular σ_{II} y $t_{o_{II}}$ para ambos solutos.

3. Calcular t de la ecuación de rendimiento de transferrina.

4. Calcular el rendimiento de sal.

5. Con los datos anteriores calcular la pureza de la transferrina.

6. La suposición de εv_{II} será correcta cuando la pureza de transferrina sea del 98 %.

De acuerdo a lo anterior el resultados es:

$$\begin{aligned} \varepsilon v_{II} &= 93\ \frac{\text{cm}}{\text{h}} \\ t &= 7.4\ \text{min} \end{aligned}$$

Esto representa aumentar 9.3 veces la velocidad en la columna. La Figura 8.21 muestra los perfiles de los solutos para el caso base y la situación nueva. Los resultados sugieren que a nivel laboratorio la optimización consiste en incrementar la velocidad manteniendo una resolución o pureza adecuada.

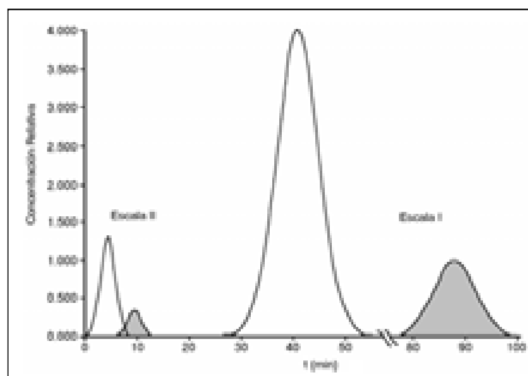


Figura 8.21: Perfiles de concentración del Ejemplo 8.9.

El análisis anterior es válido, siempre y cuando el mecanismo controlante se mantenga en ambas situaciones. También es importante hacer notar que para otro tipo de cromatografía la expresión de la desviación estándar utilizada en este ejemplo, puede ser diferente.

Los casos de escalamiento directo no lineal escapan al alcance de este trabajo pero existen varias publicaciones especializadas que pueden ser consultadas (Wankat y Koo, 1988).

Escalamiento mediante modelos El enfoque de escalamiento directo conduce a utilizar partículas muy pequeñas ($5 - 100$ μm) que incrementan el costo del proceso; aun cuando producen buena resolución, poca dispersión y tiempos cortos de ciclo. Esto se debe a que las resistencias por difusión dentro de la partícula y los fenómenos de dispersión son menores con partículas pequeñas.

Estas partículas pequeñas no siempre son las más adecuadas en un proceso industrial, dado que el objetivo en éstos es incrementar la productividad y no la resolución de todos los componentes. Por otro lado, el escalamiento directo conduce a la utilización de una fracción muy pequeña del lecho cromatográfico, aspecto que también impacta el costo. Las limitaciones del escalamiento directo han conducido a tratar de incorporar metodologías ingenieriles al diseño de las columnas. En la Figura 8.22 se presenta la metodología para el escalamiento mediante el uso de modelos de columnas.

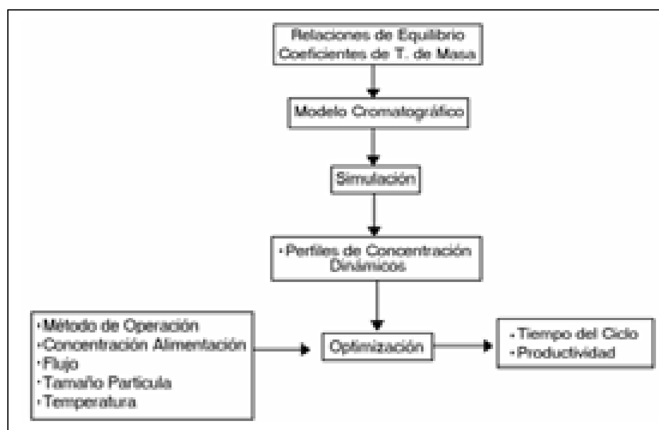


Figura 8.22: Metodología para escalamiento y optimización de columnas. Adaptada de: Wang, 1990.

Cuando se utiliza el escalamiento mediante modelos, los experimentos que se realizan, más que tener como objetivo desarrollar una optimización de la columna, están orientados a la validación del modelo y a la obtención de los parámetros del mismo.

Los modelos desarrollados son utilizados para predecir los perfiles de concentración a la salida de la columna, por medio de una simulación por computadora, así como el impacto que sobre los perfiles producen los cambios en:

a) La geometría del sistema: D_c, L y d_p.

b) La operación del sistema: flujo, concentración, volumen y tamaño de muestra.

c) Química del sistema: tipo de eluyente, tipo de adsorbente y tipo de isoterma.

d) Modo de operación.

El enfoque se orienta a obtener un diseño óptimo bajo restricciones de costos, tiempo de ciclo, productividad, pureza y concentración. Los modelos cromatográficos presentados en este capítulo son particularmente útiles cuando se trata de seguir este enfoque de escalamiento.

Posiblemente, el mejor enfoque que puede adoptarse es desarrollar un diseño por escalamiento directo y afinar este diseño mediante el empleo de modelos, para analizar aspectos cruciales de la separación.

Diseño del sistema cromatográfico

En un esquema de purificación donde participa una operación cromatográfica, el problema de diseño es determinar el número y tamaño de las columnas necesarias para cumplir económicamente con la producción con la pureza requerida del producto de interés (Simpson, 1994). El número de columnas está dado por:

$$NC = \frac{P_t}{P_{cc} \times n} \; [\equiv] \; \frac{\left(\dfrac{\text{kg}}{\text{día}}\right)}{\left(\dfrac{\text{kg}}{\text{ciclo} - \text{columna}}\right) \times \left(\dfrac{\text{ciclos}}{\text{día}}\right)} \tag{8.60}$$

donde: P_t es la producción del producto de interés (demanda), P_{cc} es la producción específica de cada columna y n es la cantidad de ciclos de operación que pueden ser realizados en cada columna al día.

La producción específica de la columna puede ser relacionada con las características de la columna,

$$P_{cc} = q_m \times V_c \times U \;\; [\equiv] \; \frac{\text{kg}}{\text{L} - \text{ciclo}} \times \frac{\text{L}}{\text{columna}} \tag{8.61}$$

donde: q_m es la capacidad máxima de la columna, V_c es el volumen de la columna y U es la fracción de la capacidad máxima de la columna utilizada en cada ciclo.

La duración de cada ciclo de operación está dada por:

$$t_c = L\left[\left(\frac{BV}{\varepsilon v}\right)_a + \left(\frac{BV}{\varepsilon v}\right)_l + \left(\frac{BV}{\varepsilon v}\right)_e + \left(\frac{BV}{\varepsilon v}\right)_r\right] + t_s \tag{8.62}$$

donde: BV son los volúmenes de columna y εv la velocidad superficial en la columna, para aplicar la muestra a, lavar l, eluir e y regenerar r la columna. El tiempo de sanitación de la columna es t_s.

Es obvio que:

$$(BV)_a = \frac{q_m \times U}{c_o} \tag{8.63}$$

Para el caso particular que t_s es despreciable,

$$NC = \frac{P_t \times L \times \left[\left(\dfrac{BV}{\varepsilon v}\right)_a + \left(\dfrac{BV}{\varepsilon v}\right)_l + \left(\dfrac{BV}{\varepsilon v}\right)_e + \left(\dfrac{BV}{\varepsilon v}\right)_r\right]}{q_m \times V_c \times U} \tag{8.64}$$

De acuerdo al resultado anterior, el número de columnas es independiente de la longitud de la columna ($L/V_c = 1/A_c$). Se producen resultados equivalentes con columnas cortas operadas frecuentemente que con columnas largas operadas con frecuencias menores. Los factores que determinan realmente la altura de lecho son la resolución, el tiempo de ciclo y la caída de presión. Es frecuente utilizar columnas cortas, donde la resolución se mejora mediante el uso de gradientes de pH o de fuerza iónica, en lugar de incrementar la longitud de la columna como sugiere la teoría cromatográfica clásica.

En el caso de muestras muy diluidas el volumen aplicado puede ser mucho mayor que los otros volúmenes de proceso, de tal manera que:

$$NC = \frac{P_t \times L}{\varepsilon\upsilon \times c_o \times V_c} \tag{8.65}$$

En este caso, el número de columnas es independiente de la longitud y capacidad de la columna.

8.5. Sumario

La cromatografía por elución se utiliza para obtener productos biotecnológicos con un alto grado de pureza. Existen varias formas para llevar a cabo una operación cromatográfica que dependen del tipo de adsorbente empleado y las condiciones en las que se realiza.

Las operaciones cromatográficas se desarrollan generalmente en columnas empacadas fabricadas en diversos tipos de materiales y operadas tanto a presiones moderadas como a altas presiones.

Las columnas cromatográficas han sido escaladas principalmente a partir de columnas de laboratorio, pero existe una creciente necesidad de apoyar el diseño de las columnas mediante el empleo de modelos. Hoy los bioprocesos bien establecidos utilizan modelos matemáticos en la optimización y simplificación de la validación de las operaciones de cromatografía. La modelación y simulación de esta operación puede ayudar a reducir tiempos y costos, en el desarrollo y operación de los bioprocesos.

8.6. Problemas

8.1. Número de platos teóricos. El ancho W de un pico es de 50 s y el tiempo de retención es de 50 min.

Se pide: Calcular el número de platos teóricos de la columna bajo estas condiciones.

Resp: 57,600.

8.2. Resolución. Los tiempos de retención de los compuestos A y B, son de 800 s y 815 s, respectivamente. La columna se puede considerar que tiene $8,100$ platos teóricos para ambos compuestos.

Se pide:

a) Calcular la resolución para estos compuestos en la columna.

b) Estimar el número de etapas para obtener una resolución de 1, suponiendo que los tiempos de retención son iguales.

Resp: a) 0.42 y b) 45,500.

8.3. Velocidad óptima. La ecuación (8.49) describe la variación de $HETP$ con la velocidad en una columna cromatográfica.

Se pide: Obtener una expresión matemática para la εv óptima y la altura equivalente de un plato teórico ($HETP$) mínima, a partir de esta ecuación.

8.4. Expresión de la resolución. Utilizando el modelo de platos teóricos y considerando iguales las $HETP$ de dos solutos que se desea separar, demostrar que:

$$Rs = \frac{(\alpha - 1)}{2(\alpha + 1)} \left(\frac{\overline{k'}}{1 + \overline{k'}} \right) N^{\frac{1}{2}}$$

esta ecuación se conoce como la ecuación fundamental de la cromatografía lineal, donde:

$\overline{k'} = \dfrac{k'_1 + k'_2}{2}$
$\alpha = \dfrac{K_2}{K_1}$
$k'_1 = \left(\dfrac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K_1$
$k'_2 = \left(\dfrac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K_2$

α: selectividad; k'_1: factor de capacidad del soluto 1; k'_2: factor de capacidad del soluto 2; $\overline{k'}$: factor de capacidad promedio; K_1: constante de equilibrio del soluto 1; K_2: constante de equilibrio del soluto 2; ε: porosidad del lecho.

8.5. Ecuación de la resolución HPLC. En el caso de la cromatografía líquida de alta resolución puede considerarse que el ancho de los picos de los solutos 1 y 2 son iguales, entonces: $W_1 = W_2$.

Se pide: Demostrar que bajo estas condiciones,

$$R_s = \frac{1}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2^{'}}{1 + k_2^{'}}\right) N_2^{1/2}$$

donde el subíndice 2 corresponde al soluto más lento.

8.6. Cálculo de resolución HPLC. En la separación de albúmina de suero de bovino (ASB) y mioglobulina (Mg), mediante una columna de laboratorio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se determinó que los factores de capacidad de los solutos son: $k_{ASB}^{'} = 0.8$ y $k_{Mg}^{'} = 1.1$.

La altura equivalente de un plato teórico para la mioglobulina está dada por:

$$HETP = 6.2 \times 10^{-5} + 1.13\varepsilon\upsilon$$

donde $HETP$ está en m y $\varepsilon\upsilon$ en m/s.

Se pide: Estimar la resolución esperada si la columna tiene un diámetro de 7.5×10^{-3} m y una longitud de 0.6 m. El volumen de la muestra es de 10^{-7} m^3 y la velocidad superficial en la columna es de 2.17×10^{-4} m/s.

Resp. $R_s = 1.58$

8.7. Escala y resolución. Utilizando la ecuación del Problema 8.4, estimar la resolución que se obtiene en una columna de 50 cm, si en una columna de 20 cm la resolución obtenida es de 0.8 (considere como única variable la longitud de la columna).

Resp: 1.27

8.8. Obtención de cromatogramas. Una mezcla contiene 70 % de una droga y 30 % de una impureza. Cuando esta mezcla se corre en una columna de laboratorio, los tiempos de retención son de 9.7 h y 8.7 h y la desviación estándar de 0.5 h y 0.2 h, respectivamente.

Se pide:

a) Calcular el rendimiento de la droga si desea obtener una pureza del 99 %.

b) Simular utilizando la computadora los perfiles de concentración, pureza y rendimiento de acuerdo a las condiciones del problema.

c) Simular el efecto de variar la proporción de soluto a 50:50 % sobre los perfiles de concentración, rendimiento y pureza.

d) Repitir la simulación para una proporción 90:10 %.

Resp: a) 66.3 %.

8.9. Volumen de proceso. Cuando se procesa una mezcla de lincomicinas A y B en una columna de partículas de celulosa, se colecta el 2.2 %, 15.8 % y 50 % de lincomicina A a 600, 650 y 700 litros de elución, respectivamente.

Se pide: Calcular el volumen para obtener un rendimiento del 95 % de lincomicina A.

Resp: 780 L.

8.10. **Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).** Una columna de laboratorio (Ghose, 1990) de 0.02 m de diámetro, se empaca con 0.065 kg de Sephadex G-100 cuyo poder hidratante es de 0.003 m^3/kg de gel seca, produciéndose un lecho empacado de 100 cm de altura.

La columna se utiliza para separar una mezcla de albúmina de suero de bovino (ASB) y glucosa. El volumen utilizado de muestra es de 2×10^{-6} m^3, el cual tiene una concentración de ASB de 5 kg/m^3 y 10 kg/m^3 de glucosa. La cromatografía se desarrolla utilizando agua como eluyente. El volumen de elución (V_o) de la ASB es de 1.05×10^{-4} m^3 y el de glucosa de 2.95×10^{-4} m^3.

El volumen vacío de la columna (εV) se midió utilizando el dextrano de alto peso molecular y fue de 1.05×10^{-4} m^3 (en cromatografía en gel donde la cantidad de líquido en los poros de la matriz es considerable, esta medición con dextrano no incluye el volumen de dicho líquido V_i).

El coeficiente de partición de los solutos A (ASB) y B (glucosa) está dado por:

$$(V_o)_A = \varepsilon V_c + K_{pA} V_i$$

$$(V_o)_B = \varepsilon V_c + K_{pB} V_i$$

donde V_c es el volumen total del lecho de la columna y K_{pA} y K_{pB} son los coeficientes de partición.

El volumen de los poros V_i puede ser calculado con la expresión:

$$V_i = a W_r$$

donde a es la masa seca de gel y W_r la capacidad hidratante del gel.

Se desea escalar la operación de esta columna a una columna de 0.06 m de diámetro y 3 m de lecho manteniendo la relación de volumen vacío a volumen total constante $(\varepsilon V_c / V_c) = Cte.$, y la relación de volumen de los poros a volumen total constante.

Se pide:

a) Determinar los volúmenes de elución de la ASB y de la glucosa en la nueva columna.

b) La masa del adsorbente a emplear en la segunda columna.

c) Demostrar que en cromatografía en gel el modelo de van Deemter conduce a:

$$K_p = \frac{V_c(1-\varepsilon)\varepsilon_p}{V_i}$$

d) ¿Cuál es el significado físico de K_p?

e) Comparar la ecuación (8.16) con la (8.39) para su uso en cromatografía en gel.

Resp. a) $(V_o)_A = 2.834 \times 10^{-3}$ m^3 y b) 1.76 kg.

8.11. **Análisis económico del costo del adsorbente.** Se desea efectuar un análisis económico de una operación cromatográfica, considerando los siguientes parámetros:

S: Costo del adsorbente. [$/kg de adsorbente].

P: Poductividad promedio. [kg de producto/kg de adsorbente-ciclo].

n: Duración del ciclo. [ciclo/h].

t: Tiempo de vida del adsorbente. [h].

C_A: Costo del adsorbente por kg de producto.[$/kg de producto].

Se pide:
a) Obtener una expresión del impacto del costo del adsorbente sobre el costo del producto.
b) Graficar C_A *vs* P para valores de S/nt de 0.1, 0.5 y 1.0, en el rango de $0 \leq P \leq 0.05$
c) En una operación cromatográfica el adsorbente tiene un costo de $10.00/kg y tiene una vida de 2,000 h. La operación se efectúa de tal forma que se inyecta una muestra cada 2.5 h y la productividad promedio P es de 0.02 kg de producto/kg de adsorbente-ciclo. Estimar el impacto del costo del adsorbente sobre el producto.
Resp. c) $C_A = \$0.625$/kg de producto.

8.12. Análisis económico. Se desea efectuar un análisis económico de una operación cromatográfica considerando los siguientes parámetros:

S: Costo del adsorbente. [$/kg de adsorbente].

P: Productividad promedio. [kg de producto/kg de adsorbente-ciclo].

n: Duración del ciclo. [ciclo/h].

t: Tiempo de vida del adsorbente. [h].

$L = nt$: Número de ciclos en la vida del adsorbente.

C_T: Costo del adsorbente, regenerante y eluyente por kg de producto. [$/kg].
M: Costo de eluyente. [$/kg de adsorbente-ciclo].

R: Costo del regenerante. [$/kg de adsorbente−ciclo de regeneración].

L_R: Ciclos/ciclo de regeneración.

Se pide demostrar que:

$$C_T = \frac{1}{PL} \times \left(S + \frac{RL^2}{L_R} + ML \right)$$

8.13. **Parámetros de la ecuación de van Deemter.** En la cromatografía de ASB se obtienen los siguientes datos experimentales:

εv (cm/s)	$HETP$ (cm)
0.005	0.12
0.010	0.19
0.015	0.26

Se pide: Estimar los parámetros A, B, y C de la ecuación de van Deemter para la columna empleada.

Resp. $A = 0.05$ cm, $B = 0$, $C = 14$ s.

8.14. **Párametros de columna.** En una separación cromatográfica se obtiene un pico de hemoglobina con una concentración máxima de 0.22 g/L a los 820 s y una concentración de 0.10 g/L a los 670 s.

Se pide: Estimar el número de etapas teóricas y la altura equivalente de una etapa teórica, si la columna utilizada tiene una longitud de 16.5 cm.

Resp. $N = 47$ y $HETP = 0.35$ cm

8.15. **Rendimiento y pureza.** En una separación cromatográfica de albúmina y hemoglobina se aplica una muestra que contiene un gramo de cada una de estas proteínas, la cual se eluye a un flujo de 5 cm^3/min, obteniéndose dos picos con las siguientes características:

	Albúmina	**Hemoglobina**
Conc. máxima	0.25 g/L	0.22 g/L
Tiempo de elución	680 s	820 s
Conc. en un tiempo t	0.11 g/L	0.10 g/L
Tiempo t	600 s	670 s

Se pide: Calcular el rendimiento y la pureza de la albúmina a los:
a) 500 s
b) 600 s
c) $1,200$ s

Resp. b) Para albúmina $RE = 0.1$ y $PR = 0.775$

8.16. **Estimación de porosidad de partícula.** La porosidad de un lecho medida con azul de dextrano es de 0.4. Cuando se corre albúmina en una columna de 16.5 cm de altura y 2.5 cm de diámetro con un flujo de 5 cm^3/min su tiempo de retención es de 680 s.

Se pide: Calcular la porosidad interna del empaque de la columna para esta proteína.

Resp. $\varepsilon_i = 0.5$

8.17. **Cálculo de difusividad.** El valor experimental para la difusión en el poro en una matriz de agarosa es de $\varepsilon_i D_i = 3.9 \times 10^{-7}$ cm^2/s.

Se pide: Comparar este valor con el que se obtiene mediante la correlación para este tipo de geles (Boyer y Hsu, 1992):

$$\varepsilon_i D_i = 8.34 \times 10^{-10} \left(\frac{T}{\mu M^{1/3}} \right) \exp \left[-0.1307 \left(M^{1/3} + 1245 \right) C_f^{1/2} \right]$$

donde:

M: Peso molecular de la mioglobina $=16,890$ Da.

T: Temperatura = 293 °K.

μ: Viscosidad del solvente = 0.01 g/cm−s.

C_f: Concentración de polímero en la partícula de adsorbente = 0.04 g/cm^3.

8.18. Análisis de la operación de una columna En una operación cromatográfica se producen dos picos. El pico A con un tiempo medio de retención de 15 min y con un ancho 2.60 min cuando la concentración es la mitad de la máxima. El pico B con un tiempo medio de retención de 10 min y con un ancho de 1.0 min cuando la concentración es la mitad de la máxima.

Se pide:

a) Estimar el número de etapas teóricas de esta columna para cada soluto.

b) Si se aumenta 3 veces la longitud de la columna manteniendo todas las otras condiciones iguales, cual será la separación de los picos en minutos.

Resp. b) 15 min

8.19. Efecto de la longitud de la columna. Se desea predecir el comportamiento del pico de un soluto cuando se dobla la longitud de una columna, utilizando la teoría de platos.

Se pide:estimar el efecto sobre:

a) El tiempo de elución.

b) La altura del pico.

c) El ancho del pico.

Resp. c) La anchura aumenta en $\sqrt{2}$

Problema 8.20. Rendimiento: proceso vs operación. Se requiere purificar lotes de $20,000$ L de un caldo que contiene de MaBs a una concentración de 2.5 g/L. De acuerdo a la forma del pico de elución del soluto, la columna cromatográfica disponible puede operarse de las dos formas siguientes:

	I	**II**
Ciclos/lote	5	5
Volumen colectado (L/ciclo)	$1350 - 1800$	$1350 - 1600$
Conc. promedio (g/L)	21.3	36.8
Ciclos /año	18	20

Se pide calcular para cada alternativa:
a) El rendimiento por lote.
b) Masa purificada anual.
Resp. b) $m_{II} = 920$ kg.

8.7. Bibliografía

Arnold, F.H.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. **1985**. Analysis of affinity separations. *Chem. Eng. J.* 30, B9-B23.

Asenjo, J.A.; Andrews, B.A. **2009**. Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. *J. Mol. Recognit.* 22, 65-76.

Azevedo A.M.; Rosa, P.A.J.; Ferreira, I.F.; de Vries, J.; Visser, T.J.; Aires-Barros, M.R. **2009**. Downstream processing of human antibodies integrating an extraction capture step and cation exchange chromatography. *J. Chromatog. B.* 877, 50-58.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley and Sons. New York. 7, 183-219.

Bird, R.B.; Stewart, W.E.; Lightfoot, E.N. **2002**. *Transport Phenomena.* John Wiley and Sons. New, York. 2da Edición.

Boyer, P.M.; Hsu, J.T. **1992**. Experimental studies of restricted protein diffusion in agarose matriz. *AIChE, J.* 38, 259-272.

Cowan, G.H.; Gosling, J.F.; Sweetenham, W.P. **1987**. Modeling for scale-up and optimisation of packed-bed columns in adsoption and chromatography. En: *Separations for biotechnology.* Verral, M.S.; Hudson, M.S. (Eds.). Ellis Horwood. England. 10, 152-175.

Curling, J. **2007**. Process chromatography: Five decades of innovation. *Biopharm Internatinal.* 20, 10-48.

Fulton, S.P.; Meys, M.; Várady, L., Jansen, R.; Afeyan, M.B. **1991**. Antibody quantification in seconds using affinity perfusion chromatography. *Biotechecniques.* 11, 226-231.

Furusawa, T.; Suzuki, M.; Smith, J.M. **1976**. *Catal. Rev. Sci.* Eng. 13, 43-76.

Ghose, T.K. 1990. *Bioprocess computations in biotechnology.* Vol. 1. Ellis Horwood. New York. 9, 229-264.

Gibbs S.J.; Lighfoot E.N. **1986**. Scaling up gradient elution chromatography. *IEC Fund.* 25, 490-498.

Janson J. C.; Hedman, P. **1982**. Large scale chromatography of proteins. En: *Adv. Biochem. Eng.* Fiechner, A. (Ed.). Springer-Verlag. New York. 25, 43-99.

Janson J. C.; Hedman, P. **1987**. On the optimization of process chromatography of proteins. *Biotech. Prog.* 3, 9-13.

Knox J. ; Pyper, H.M. 1986. Framework for maximizing throughput in preparative liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 363, 1-56.

Ladisch, M.R. **1987**. Separation by sorption. En: *Advanced Biochemical Enginnering*. Bungay, H.R.; Belfort, G. (Eds.). John Wiley and Sons. New York. 9, 219-237.

Lapidus, L.; Amundson, N.R. **1952**. The effect of longitudinal diffusion in ion exchange and chromatographic columns. Mathematics of adsorption in beds VI. *J. Phys. Chem.* 56, 984-988.

Nicoud, R.M.; Perrut, M. **1991**. Operating modes, scale-up and optimization of chromatographic processes. En: *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*. Costa, C.A.; Cabral, J.S. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 381-413.

Simpson, J.M. **1994**. Conventional chromatography. En: *Protein purification engineering*. Harrison, R.G. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 7, 209-258.

van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F.J.; Klinkenberg, A. **1956**. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.* 5, 271-289.

Wang, N.L. **1990**. Ion exchange in purification. En: *Separation processes in biotechnology*. Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 12, 359-400.

Wankat, P.C; Koo, Y. **1988**. Scaling rules for isocratic elution chromatography. *AIChE J.* 34, 1006-1019.

Capítulo 9

Precipitación

9.1. Introducción

Precipitación es el proceso en el que un soluto soluble se separa en forma de sólido insoluble de una solución mediante la acción de un agente precipitante. Algunos productos biotecnológicos presentan solubilidades que varían con la temperatura, el pH, la fuerza iónica y con la constante dieléctrica del medio. Esta propiedad puede ser utilizada para concentrar y purificar estos productos mediante la operación de precipitación. A nivel industrial puede ser utilizada para la obtención de productos proteicos y nucleicos.

Teóricamente la precipitación debe producir un soluto concentrado y relativamente puro, por lo que es una operación que se usa con frecuencia al inicio de un proceso de bioseparación. Los agentes precipitantes seleccionados no deben producir desnaturalización del soluto y deben proveer una mayor estabilidad del soluto en el precipitado que en la solución.

La precipitación de proteínas y la subsecuente recuperación del precipitado, son de las operaciones más importantes para la recuperación y purificación de proteínas tanto a nivel laboratorio como a escala industrial.

Las ventajas de usar la precipitación para la concentración y purificación de solutos son, entre otras, las siguientes:

1. Es relativamente barata.

2. Es una operación que se adapta fácilmente a gran escala.

3. Puede realizarse en forma continua.

4. El equipo que se utiliza es sencillo.

5. Se dispone de diversos agentes precipitantes y en muchos casos éstos son baratos.

Este capítulo se enfoca a la precipitación de proteínas debido a su gran interés biotecnológico. En la sección 9.2 se revisan los fundamentos de la precipitación

incluyendo algunos métodos para la precipitación de proteínas. En la Sección 9.3 se hace mención de los equipos utilizados en esta operación y en la Sección 9.4 se presentan algunos aspectos del diseño de dichos equipos.

9.2. Fundamentos

La precipitación de proteínas puede realizarse empleando diferentes principios (Tabla 9.1).

Tabla 9.1: Principios de la precipitación de proteínas.

Principio	**Agente Precipitante**
Disminución de la solubilidad	Sales (Sulfato de Amonio) pH (Precipitación isoeléctrica) Solventes (etanol) Polímeros no iónicos
Desnaturalización selectiva.	Temperatura pH Solventes
Afinidad	Ligandos

La precipitación por disminución de la solubilidad de la proteína de interés se efectúa por medio de un agente precipitante. Este puede ser una sal neutra como el sulfato de amonio; un agente que altere el pH de la solución; un solvente orgánico como etanol, acetona o éter; o algún polímero como el polietilenglicol.

En la desnaturalización selectiva se producen cambios en la conformación de las proteínas contaminantes con el propósito de aislar en la solución la proteína de interés, utilizando como agentes precipitantes temperatura, pH y algunos solventes orgánicos.

Un tipo reciente de precipitación lo conforman los métodos que se basan en la capacidad que tienen las proteínas de formar complejos mediante la interacción de los sitios activos de éstas con ligandos específicos.

En esta sección se revisan los tres métodos básicos de precipitación:

- Precipitación por disminución de la solubilidad.
- Precipitación por desnaturalización selectiva.
- Precipitación por afinidad.

9.2.1. Precipitación por Disminución de la Solubilidad

El hecho de que las proteínas sean moléculas anfotéricas se debe a que sus superficies (Fig. 9.1) presentan regiones hidrofóbicas, y regiones hidrofílicas cargadas ya sea positiva o negativamente.

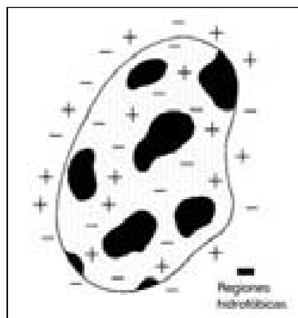


Figura 9.1: Esquema de la distribución de carga y de zonas hidrofóbicas en una molécula de proteína típica.

Debido a su naturaleza anfotérica cuando una proteína se encuentra en solución acuosa produce complejas interacciones con la solución que la rodea. Particularmente, cuando se agrega un agente precipitante a la solución, las proteínas que presentan mayor hidrofobocidad (por contar con mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie) precipitan más fácilmente que las de menor hidrofobicidad. En el primer caso las proteínas tienen una baja solubilidad y en el segundo caso una alta solubilidad. De lo anterior se desprende que la estructura de la proteína determina su solubilidad.

La proteína permanece en solución cuando termodinámicamente es más favorable estar rodeada por el solvente que estar en un agregado con otra proteína formando una fase sólida. La proteína puede insolubilizarse ya sea cambiando las características de su superficie, o cambiando el solvente que la rodea. Como el cambiar las características de la superficie de la molécula puede implicar cambiar la proteína misma, generalmente se opta hacer cambios en el solvente que alteren la solubilidad de la proteína.

Los métodos utilizados para la precipitación de proteínas que se revisan en esta sección y que están basados en la disminución de la solubilidad por alteración del solvente son: a) precipitación con sales, b) precipitación isoeléctrica, c) precipitación con solventes y d) precipitación con polímeros no iónicos.

Precipitación con sales

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas para la purificación de enzimas es la llamada precipitación por insolubilización por salado o "salting out" (Cheng *et al.*, 2006), que se realiza agregando altas concentraciones de sal a la solución en la que se encuentra la proteína para producir su precipitación.

La Figura 9.2 muestra una curva característica de la solubilidad de una proteína como una función de la concentración de la sal en el medio. En esta figura se pueden apreciar dos regiones, la primera del lado izquierdo de la figura, donde la solubilidad de la proteína se incrementa con la concentración de la sal, llamada región de solubilización por salado o "salting-in", y la otra donde la solubilidad de la proteína disminuye a medida que la concentración de sal aumenta llamada región de insolubilización por salado o "salting out". El punto máximo de esta curva es característico de cada tipo de proteína.

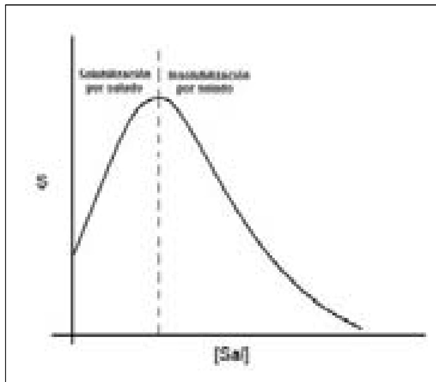


Figura 9.2: Efecto de la concentración de sal en la solubilidad de proteínas: regiones de solubilización e insolubilización por salado.

Mecanismo La descripción simplificada del mecanismo de insolubilización por salado está basada en el hecho de que la adición de las sales elimina el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente (Glatz, 1990). Aquellas proteínas que presentan mayor número de regiones hidrofóbicas sobre su superficie, forman agregados y precipitan más rápidamente que aquellas que presenten pocas regiones hidrofóbicas. Debido a esta propiedad hay proteínas que pueden permanecer en solución a altas concentraciones de sal.

Una descripción más detallada de la precipitación con sales es la siguiente (Scopes, 1994): cuando las moléculas de proteína están en solución generalmente presentan una carga neta negativa sobre su superficie y atraen los átomos de hidrógeno del agua formando una primera capa ordenada de moléculas de agua como el que se muestra en la Figura 9.3, llamada capa de Stern. A su vez esta capa está rodeada por una capa conocida como de Guoy-Chapman donde más del 70 % de las moléculas de agua no presentan una orientación particular. Este ordenamiento evita la formación de agregados proteicos. Cuando se agrega sal al medio se reduce el espesor de la doble capa y se disminuye la solubilidad de la proteína.

La precipitación de proteínas utilizando sales se puede representar como una

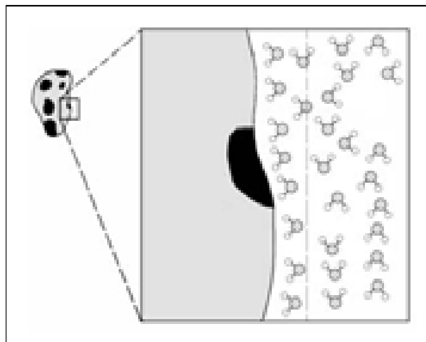
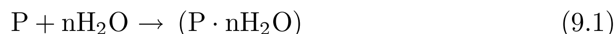


Figura 9.3: Ordenamiento de las moléculas de agua frente a las regiones hidrofóbicas de la molécula de proteína.

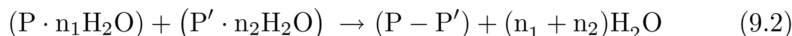
serie de tres pasos. En el primer paso se considera la disolución de la proteína en agua y se representa por la ecuación siguiente:



$$\mathrm{P + nH_2O \rightarrow (P \cdot nH_2O)} \tag{9.1}$$

donde nH_2O simboliza el agua ordenada alrededor de los residuos hidrofóbicos de la proteína P. Debido a este ordenamiento la entropía del proceso ΔS_1^o es grande y negativa. Es conocido que este proceso es espontáneo y entonces la energía libre ΔG_1^o es negativa. Consecuentemente la entalpía ΔH_1^o es muy negativa ($\Delta H^o = \Delta G^o + T\Delta S^o$).

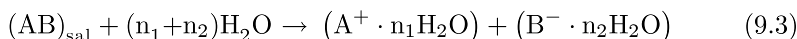
En el segundo paso que es hipotético, se considera a dos moléculas de proteína en solución que podrían unirse al interactuar a través de sus residuos hidrofóbicos, liberando agua de acuerdo a la reacción siguiente:



$$\mathrm{(P \cdot n_1H_2O) + \left(P' \cdot n_2H_2O\right) \rightarrow (P - P') + (n_1 + n_2)H_2O} \tag{9.2}$$

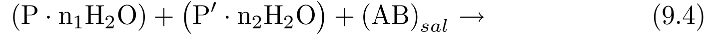
donde $(P - P')$ representa el agregado de proteína que puede ser formado. En este segundo paso $\Delta S_2^o >> 0$ y $\Delta H_2^o \simeq -\Delta H_1^o$. De tal manera que ΔG_2^o puede ser pequeño y su signo depende de la magnitudes de ΔS_2^o y ΔH_2^o. La ΔG_2^o a bajas concentraciones de sal será positiva para una proteína soluble en agua. Puesto que la proteína es soluble no ocurre la agregación dada por la ecuación (9.2).

En el tercer paso se agrega una sal a la solución, las moléculas de agua liberadas de acuerdo al proceso hipotético de la ecuación (9.2) son atrapadas por la sal, se producen agregados de proteína y éstos precipitan. Esto es:

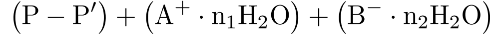


$$\mathrm{(AB)_{sal} + (n_1{+}n_2)H_2O \rightarrow \left(A^+ \cdot n_1H_2O\right) + \left(B^- \cdot n_2H_2O\right)} \tag{9.3}$$

para esta reacción ΔH_3^o es positiva. El proceso completo puede describirse de la siguiente manera:



$$(\mathrm{P} \cdot \mathrm{n_1H_2O}) + \left(\mathrm{P'} \cdot \mathrm{n_2H_2O}\right) + (\mathrm{AB})_{sal} \rightarrow \tag{9.4}$$



$$\left(\mathrm{P} - \mathrm{P'}\right) + \left(\mathrm{A^+} \cdot \mathrm{n_1H_2O}\right) + \left(\mathrm{B^-} \cdot \mathrm{n_2H_2O}\right)$$

La Figura 9.4 muestra un esquema del efecto de una sal en la precipitación de proteínas (insolubilización por salado) basado en el proceso descrito anteriormente.

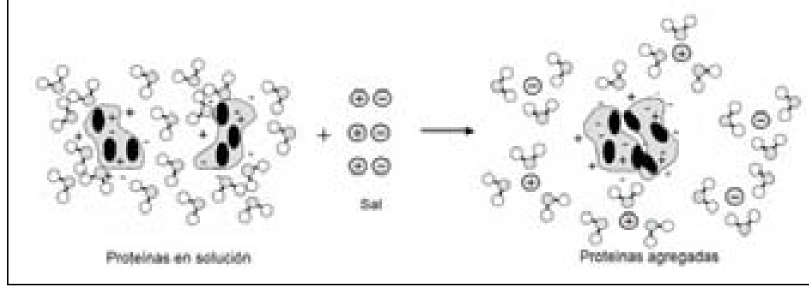


Figura 9.4: Esquema de la precipitación de proteínas por insolubilización por salado.

Ecuación de la precipitación con sales El mecanismo descrito anteriormente proporciona una explicación para la precipitación de proteínas por insolubilización por salado, sin embargo la teoría de este fenómeno aún está en desarrollo. Debido a lo anterior los modelos de precipitación más utilizados son de carácter empírico, como el de Cohn que se expresa como:

$$\log \frac{S}{S_0} = \beta - k[I] \tag{9.5}$$

donde:

S: Solubilidad de la proteína a una fuerza iónica dada.

S_0: Solubilidad a fuerza iónica cero.

I: Fuerza iónica.

β: Constante característica.

k: Pendiente de la curva de insolubilización por salado.

La fuerza iónica de una solución está dada por:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \tag{9.6}$$

donde:

C_i: Concentración del ión.

Z_i: Carga del ión.

La ecuación de Cohn se puede escribir en forma simplificada como:

$$\log S = A - m[\text{conc. de sal}] \tag{9.7}$$

la ecuación (9.7) es la ecuación de una recta con pendiente m y ordenada al origen A. En esta ecuación:

S: Solubilidad de la proteína a un valor dado de concentración salina.

S_0: Solubilidad a fuerza iónica cero.

A: Constante que depende fuertemente del pH y la temperatura. Esta constante usualmente toma un valor mínimo en el punto isoeléctrico, es característica de cada proteína e independiente del tipo de sal.

m: Pendiente de la curva de insolubilización por salado. Esta es independiente del pH y de la temperatura, pero varía con el tipo de sal y de proteína. Las sales que contienen aniones polivalentes tales como sulfatos y fosfatos tienen valores de m mayores que las sales univalentes. Los cationes polivalentes como el calcio o el magnesio disminuyen los valores de m.

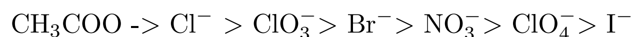
Los datos experimentales que se presentan en la Figura 9.5a permiten apreciar el grado de ajuste del modelo dado por la ecuación (9.7) para dos casos: el de una enzima pura y el de una mezcla de enzimas. Se observa para este último caso una ligera desviación respecto al comportamiento teórico. En la Figura 9.5b se muestra otro ejemplo experimental de precipitación de proteína que obedece la ecuación (9.7) (la escala de las ordenadas es logarítmica). En esta figura se observa que el comportamiento lineal depende de la concentración inicial de la enzima.

Naturaleza de la sal La naturaleza de la sal utilizada en el proceso descrito por la ecuación (9.3) es un aspecto muy importante a considerar. Las sales que producen enlaces e interactúan directamente con la proteína tienen efectos desestabilizadores. Las sales que producen mejores resultados, esto es, una mayor precipitación de la proteína, son aquellas que producen deshidratación de las regiones hidrofóbicas y fomentan la hidratación de las regiones polares de la proteína, sin interaccionar directamente con ésta. Existen reglas heurísticas para seleccionar la sal más adecuada para un proceso de precipitación, algunas de ellas son las siguientes:

1. Los aniones son más efectivos en el siguiente orden (Series de Hofmeister):



$$\text{citrato}^{-3} > \text{tartato}^{-2} > SO_4^{-2} > F^- > IO_3^- > H_2PO_4^- >$$



$$CH_3COO^- > Cl^- > ClO_3^- > Br^- > NO_3^- > ClO_4^- > I^-$$

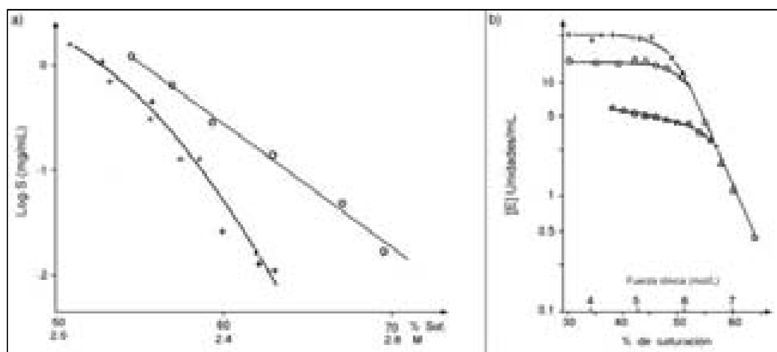


Figura 9.5: a) Solubilidad de aldolasa de músculo de conejo a pH 7.0 en solución de sulfato de amonio: (o) solubilidad de la enzima pura; (+) solubilidad en una mezcla de enzimas de músculo de conejo: aldolasa, piruvato kinasa, gliceraldehido fosfatasa deshidrogenasa y lactato deshidogenasa en proporciones 3:3:3:1. Fuente: Scopes, 1994. Reproducida con el permiso de Springer-Verlag. Copyright ©1994. Todos los derechos reservados. b) Efecto de la concentración de fumarasa sobre la insolubilización por salado con sulfato de amonio a 6 °C. Concentración inicial de enzima. (△) 5.4, (o) 15.2 y (+) 25.2. Adaptada de Bell *et al.*, 1983. Reproducida con el permiso de Springer-Verlag. Copyright ©1983. Todos los derechos reservados.

2. Los cationes son efectivos en el siguiente orden:



$$NH_4^+ > K^+ > Na^+$$

3. Seleccionar una sal que sea barata debido a las altas concentraciones que requiere el método.

4. Seleccionar una sal que produzca un precipitado cuya densidad sea diferente a la de la solución para facilitar su separación.

5. Añadir la sal en forma sólida y no como solución, para minimizar la dilución.

Ejemplo 9.1. Determinación de la solubilidad de piruvato quinasa de músculo de conejo.

En un experimento de precipitación de la enzima piruvato quinasa con sulfato de amonio a pH 7.0, se obtuvieron los siguientes resultados (Scopes, 1994):

S (mg/mL)	**Concentración** sulfato de amonio (M)
0.0064	2.85
0.0140	2.80
0.0700	2.60
0.0300	2.50
0.3700	2.45
0.8000	2.38
1.1000	2.34

Se pide:

a) Determinar los parámetros de la ecuación de solubilidad A y m.

b) Calcular la solubilidad de la enzima predicha por el modelo a una concentración 2.34 M de sulfato de amonio.

Solución:

a) Parámetros de solubilidad. De acuerdo a la ecuación (9.7) la solubilidad de la enzima está dada por:

$$\log S = A - m[\text{conc. sal}]$$

donde A es la ordenada al origen y m es la pendiente de la curva.

Para determinar los valores de los parámetros de la ecuación anterior, los valores experimentales se ajustan por mínimos cuadrados y se obtiene que $A = 10.2$ y $m = -4.34$. La Figura 9.6 muestra la gráfica correspondiente.

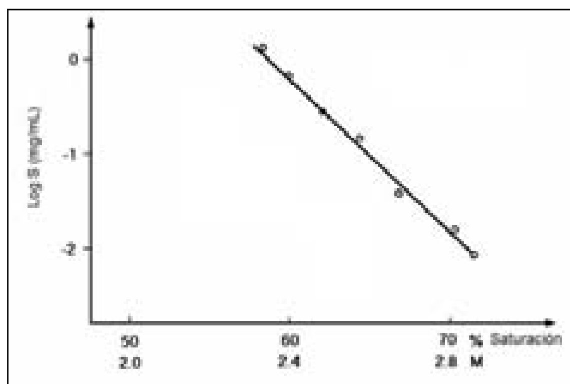


Figura 9.6: Variación de la solubilidad de la enzima piruvato quinasa en función de la concentración de sulfato de amonio. Fuente: Scopes, 1994.

La ecuación de solubilidad para la enzima piruvato quinasa está dada por:

$$\log S = 10.2 - 4.34 \times [\text{conc. sal}]$$

b) Solubilidad. Sustituyendo el valor de la concentración salina en la expresión anterior, se tiene que la solubilidad de la enzima a una concentración 2.34 M de sulfato de amonio es:

$$S = 1.2 \text{ mg/mL}$$

Precipitación isoeléctrica

Otra técnica muy utilizada para precipitar proteínas se basa en la disminución de su solubilidad en el punto isoeléctrico.

Mecanismo Las proteínas por su naturaleza anfotérica presentan una carga neta negativa a pH altos y una carga neta positiva a pH bajos. Existe un pH llamado pH isoeléctrico al cual la carga neta de la proteína es cero. A este pH la molécula es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico.

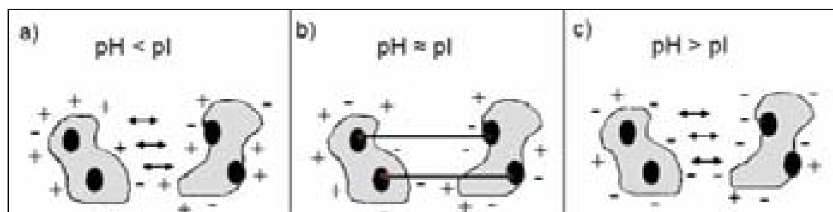


Figura 9.7: Representación esquemática del efecto de las fuerzas electrostática sobre la proteína: a) Repulsión a pH bajos, b) Baja interacción a pH isoeléctrico y c) Repulsión a pH altos.

En la Figura 9.7 se muestran los tipos de interacción que se presentan entre moléculas cargadas a diferentes pHs.

- Cuando la proteína se encuentra a un pH diferente de su pH isoeléctrico, las moléculas proteicas poseen una carga eléctrica neta del mismo signo. Debido a esto existe una repulsión electrostática entre las moléculas ocasionando que su solubilidad se incremente.

- En el punto isoeléctrico el efecto de las fuerzas electrostáticas entre las proteínas es casi nulo. En estas condiciones la solubilidad de la proteína es mínima, y en consecuencia las moléculas de proteína tienden a unirse y a precipitarse. A este tipo de precipitación se le llama precipitación isoeléctrica.

La Figura 9.8 muestra una curva típica de la variación de la cantidad de proteína no precipitada con respecto al pH. En esta figura puede observarse que existe un pH al cual la fracción de proteína no precipitada es mínima, éste es el pH isoeléctrico.

Cada proteína tiene un pH isoeléctrico característico por lo que la precipitación isoeléctrica puede utilizarse como una operación de purificación de proteínas. Sin embargo, cabe hacer notar que hay algunas proteínas como las globulinas, que presentan una solubilidad considerable aún cuando se encuentren

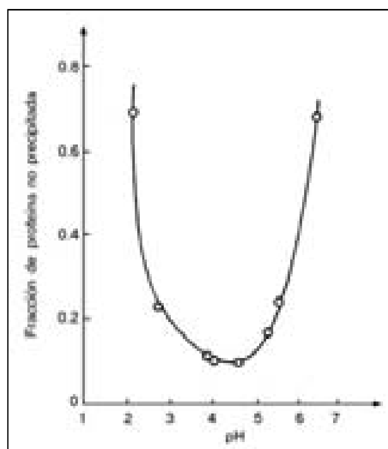


Figura 9.8: Efecto del pH sobre la concentración de proteína de soya que permanece en solución, expresada como una fracción de la concentración inicial del extracto acuoso. Fuente: Bell *et al.,* 1983.

en su pH isoeléctrico. En la Tabla 9.2 se muestran pH's isoeléctricos de algunas proteínas.

Selección del agente precipitante. La precipitación isoeléctrica comúnmente se realiza a pH's ácidos, debido a que los ácidos son baratos y varios de ellos como el fosfórico, clorhídrico y sulfúrico son aceptables en productos alimenticios (Salcedo-Chávez *et al.*, 2002). La principal desventaja de usar ácidos es su potencial de producir daños irreversibles a la proteína.

Precipitación con solventes

La precipitación de las proteínas de una solución también puede realizarse mediante la adición de un solvente orgánico ligeramente polar.

Mecanismo El agua se caracteriza por su alta constante dieléctrica (Tabla 9.3), esto significa que los iones en solución acuosa presentan interacciones más débiles que en otros medios.

Cuando se agrega un solvente orgánico como etanol o acetona, a una solución acuosa de proteínas (a un pH y temperatura dados), se producen agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar. Este efecto se debe principalmente a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de la proteína, y en consecuencia una disminución de la solubilidad de ésta.

Tabla 9.2: pH isoeléctrico de algunas proteínas.

Proteína	pH
Pepsina	~ 1.0
Ovoalbúmina	4.6
Seroalbúmina	4.0
Ureasa	5.0
β -Lactoglobulina	5.2
γ_1 - Globulina	6.6
Hemoglobina	6.8
Mioglobina	7.0
Ribonucleasa	9.6
Lisozima	11.0

Tabla 9.3: Constante dieléctrica de algunos líquidos a 20 °C.

Líquido	D
Agua	80.0
Metanol	33.0
Etanol	24.0
Acetona	21.4
Benceno	2.3
Hexano	1.9

Otra forma de explicar la precipitación por solventes (Fig. 9.9) consiste en considerar un desplazamiento global del agua por el solvente, conjuntamente con una inmovilización parcial de las moléculas de agua por la hidratación del solvente. El solvente puede desplazar las moléculas ordenadas de agua de las regiones hidrofóbicas estimulando la precipitación de la proteína.

Debido a que la influencia de la constante dieléctrica es muy sensible a la temperatura, este tipo de precipitación debe trabajarse a temperaturas bajas. Por ejemplo, la precipitación de proteínas de plasma humano utilizando etanol, se lleva a cabo a temperaturas tan bajas como -10 °C. Trabajar con temperaturas por arriba de 10 °C provoca desnaturalización de la proteína.

Ecuación de la precipitación con solventes La expresión que relaciona el cambio en la solubilidad de una proteína en su punto isoeléctrico con un cambio en la constante dieléctrica del medio es una expresión empírica (Bell *et al.*, 1983) que está dada por:

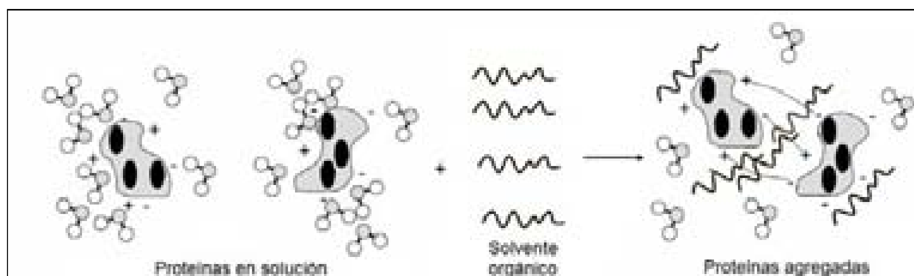


Figura 9.9: Representación esquemática de las interacciones electrostáticas de agregación entre las proteínas en presencia de un solvente orgánico. Fuente: Scopes, 1994.

$$\log S = \log S_o + \frac{K}{D_s^2} \tag{9.8}$$

donde:

D_s: Constante dieléctrica de la mezcla solvente-agua, misma que varía dependiendo de la cantidad de solvente agregada.

K : Constante que toma en cuenta la constante dieléctrica original del medio acuoso.

S_o: Solubilidad extrapolada.

Selección del solvente La mayor desventaja de la precipitación con solventes es la desnaturalización que puede sufrir la proteína por acción del solvente, de tal manera que es importante seleccionar adecuadamente éste. En el caso del uso de monoalcoholes como solventes, la desnaturalización se incrementa conforme la cadena alquilo se incrementa.

También debe tenerse muy en cuenta la flamabilidad del solvente principalmente cuando se trabaja a gran escala, ya que algunos de ellos como los alcoholes son altamente inflamables y el uso seguro de los mismos ocasiona incrementos en los costos.

Algunos criterios que es necesario considerar en la selección del solvente es que éste debe ser: a) completamente miscible en agua, b) no reactivo con las proteínas, c) un buen agente precipitante y d) seguro.

Precipitación con polímeros no iónicos

La precipitación de proteínas también puede realizarse utilizando polímeros neutros como el polietilenglicol (PEG) en lugar de sales o solventes. Dichos polímeros de elevado peso molecular son solubles en agua y sus soluciones presentan viscosidades moderadas (Guo *et al.*, 1996).

Mecanismo El mecanismo por el cual ocurre la precipitación cuando se utilizan estos polímeros no está claramente establecido, sin embargo existen dos modelos que permiten una buena comprensión de este fenómeno. Los modelos desarrollados por Ogston y Laurent (Clark, 1989) conducen a una ecuación de solubilidad de la misma forma que la ecuación (9.7), y sugieren que los polímeros excluyen a las proteínas de parte de la solución y reducen la cantidad efectiva de agua disponible para su solvatación.

El modelo de Ogston se basa en la teoría termodinámica y concluye que los sistemas (proteína en solución acuosa-polímero) pueden ser explicados en términos de los coeficientes de interacción proteína-polímero, y proteína-proteína de las especies presentes.

El modelo propuesto por Laurent se basa en un mecanismo de exclusión geométrica de regiones hidratadas de la proteína por el polímero. El modelo de Laurent (Juckes, 1971) considera a la proteína como una esfera y al polímero como un cilindro, supone que la proteína es incapaz de distribuirse dentro del polímero y, por lo tanto, que la solubilidad (S) de la proteína es proporcional sólo al volumen disponible (V_d) dado por:

$$V_d = \exp\left[-\pi l(r_s + r_p)^2\right] \tag{9.9}$$

donde:

r_s: Radio de la molécula de proteína. $[L]$.

r_p: Radio del cilindro del polímero. $[L]$.

l: Longitud total de la molécula de polímero por unidad de volumen. $[L]$.

Considerando que el volumen total (V_t) es igual al volumen disponible (V_d) más el volumen excluido (V_e), el volumen excluido por peso del polímero (W) está dado por:

$$\frac{V_e}{W} = \frac{1}{C}(1 - 10^{-\mathrm{K}C}) \tag{9.10}$$

donde: C es la concentración del polímero y

$$K = \frac{\overline{v}}{2.303}\left(\frac{r_s + r_p}{r_p}\right)^3$$

donde $\overline{v}$ es el volumen parcial específico del polímero.

La fracción de volumen excluido $V_{e'}$ y la fracción de volumen disponible $V_{d'}$ están dadas por las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} V_{e'} &= 1 - 10^{-\mathrm{K}C} \\ V_{d'} &= 10^{-\mathrm{K}C} \end{aligned}$$

como la solubilidad de la proteína es proporcional a la fracción de volumen disponible:

$$S = k \times 10^{-KC}$$

donde k es una constante de proporcionalidad. La ecuación anterior puede ser escrita en forma más conveniente como:

$$\log S = \log k - KC$$

o bien como:

$$\log S = X - KC \tag{9.11}$$

que es la ecuación de una recta con pendiente K y ordenada en el origen X.

El uso de la ecuación (9.11) proporciona un resultado similar (Juckes, 1971) al que se obtiene utilizando el volumen disponible expresado en la ecuación (9.9). La ecuación (9.11) es equivalente a la ecuación correspondiente a la precipitación por insolubilización por salado.

El modelo de Ogston que se deriva de una simplificación termodinámica, establece que la proteína permanece en solución siempre que su potencial químico en solución sea menor que su potencial en la fase precipitada. Considera que el potencial químico de la proteína μ_i en presencia de un polímero, está dado por:

$$\mu_i = \mu_i^o + RT(\ln m_i + c_{ii}m_i + c_{ij}m_j) \tag{9.12}$$

donde:

i: Proteína.
j: Polímero.
μ_i^o: Potencial químico de la proteína en el estado estándar.
R: Constante de los gases ideales.
T: Temperatura absoluta.
m_i: Molalidad de la proteína.
m_j: Molalidad del polímero.
c_{ii}: Coeficiente de interacción proteína-proteína.
c_{ij}: Coeficiente de interacción proteína-polímero.

Cuando la molalidad del polímero m_j se incrementa, el potencial químico se eleva y el sistema reacciona insolubilizando proteína (iniciándose la precipitación). Después de ésto el potencial permanece constante.

En un sistema polietilenglicol-proteína en solución acuosa, en el que solamente las interacciones polietilenglicol-proteína y proteína -proteína son significativas, la ecuación (9.12) puede ser escrita como (Foster *et al.,* 1973):

$$\frac{(\mu_i - \mu_i^o)}{\mathsf{R}T} = \ln S + fS + aC \tag{9.13}$$

donde:

S: Solubilidad de la proteína.
C: Concentración de polietilenglicol.
f : Coeficiente de interacción proteína-proteína.
a: Coeficiente de interacción proteína-polietilenglicol.

La ecuación (9.13) puede ser rearreglada en forma más conveniente como:

$$\ln S + fS = X - aC \tag{9.14}$$

donde:

$$X = \frac{\mu_i - \mu^o}{\mathsf{R}T}$$

En este sistema puede suponerse que el término fS es mucho más pequeño que $\ln S$ entonces la ecuación (9.14) puede ser escrita como:

$$\ln S = X - aC \tag{9.15}$$

que resulta ser análoga a la ecuación de insolubilización por salado. La ecuación (9.15) puede ser utilizada para calcular la solubilidad de la proteína a diferentes concentraciones del polímero.

La Figura 9.10 muestra el comportamiento de la solubilidad de la alcohol deshidrogenasa en función de la concentración de PEG, a dos niveles de concentración de la enzima. Se puede apreciar que la concentración de PEG requerido para reducir la solubilidad depende de la concentración de enzima. El grado de ajuste del modelo dado por la ecuación (9.15) depende de la concentración de la enzima (Fig. 9.10a), de tal manera que cuando la concentración de la enzima es alta es necesario considerar la ecuación 9.14 con el el término de interacción proteína-proteína fS para un mejor ajuste (Fig. 9.10b).

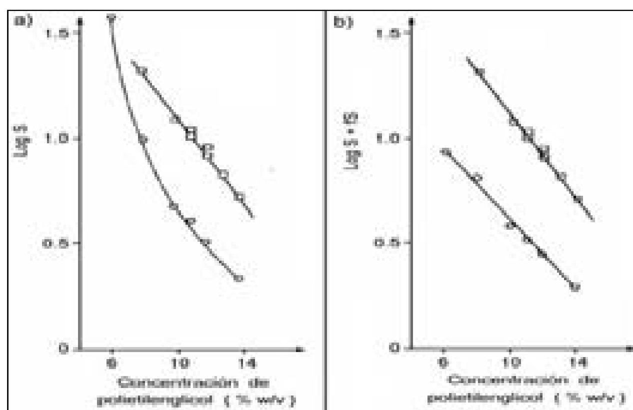


Figura 9.10: Relación entre la solubilidad S de la alcohol deshidrogenasa y la concentración C de PEG a dos concentraciones de la enzima: (□) 8 mg/mL; (o) 75 mg/mL. a) *log* S vs C y b) (*log* $S + fS$) vs C. Fuente: Foster, *et al.*, 1973.

Selección del polímero Es importante seleccionar adecuadamente el polímero que se utilice como agente precipitante. Varios tipos de polímeros pueden ser efectivos en la precipitación de las proteínas, el inconveniente es que algunos pueden generar una alta viscosidad que dificulta su manejo.

El polietilenglicol es un polímero disponible en varios grados de polimerización y presenta una viscosidad moderada. El polietilenglicol de peso molecular 4,000 o mayor es más efectivo en la precipitación de proteínas que el de bajo peso molecular. Se ha observado también (Bell *et al.,* 1983) que se requieren bajas concentraciones de polietilenglicol para precipitar proteínas de alto peso molecular, mientras que para precipitar proteínas de bajo peso molecular las concentraciones deben ser mayores.

Una ventaja adicional de la precipitación con polímeros no iónicos es que éstos estabilizan la proteína y permiten realizar la precipitación a temperatura ambiente. Además, a diferencia de la precipitación por salado en la cual debe eliminarse la sal antes de seguir con cualquier operación de fraccionamiento por intercambio iónico, los polímeros no iónicos generalmente pueden ser eluidos durante el paso de la proteína por un intercambiador iónico.

Precipitación con polímeros iónicos

Recientemente, se han utilizado polielectrolitos aniónicos en la precipitación de anticuerpos monoclonales, sin afectar la actividad biológica de éstos. Los mejores resultados implican un compromiso entre el pH de trabajo y el peso molecular del polímero (McDonald *et al.*, 2009).

9.2.2. Precipitación de Proteínas por Desnaturalización Selectiva

Los métodos de precipitación por disminución de la solubilidad son efectuados a condiciones moderadas de tal manera que la proteína de interés no se desnaturalice. Si la proteína que se desea purificar presenta estabilidad en condiciones extremas de temperatura, pH, o en solventes orgánicos, puede utilizarse esta propiedad en las primeras etapas del proceso de purificación sujetando a la solución de proteínas a estas condiciones extremas, de tal manera que se eliminen por desnaturalización las proteínas contaminantes y se obtenga una buena recuperación de la proteína deseada.

El objetivo de la desnaturalización selectiva es crear las condiciones en las cuales la proteína de interés no se desnaturaliza o su desnaturalización es mínima.

Desnaturalización por temperatura

En general las proteínas son muy sensibles a la temperatura. Sin embargo, hay proteínas que se mantienen estables a temperaturas altas. Cuando esto sucede, puede usarse la temperatura para desnaturalizar y precipitar proteínas contaminantes y aislar la proteína de interés.

El proceso de desnaturalización de la proteína por efecto de la temperatura puede ser descrito como un proceso de primer orden de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{d[P]}{dt} = -k[P] \tag{9.16}$$

donde:

$[P]$: Concentración de proteína disuelta. $[M/L^3]$.

t: Tiempo. $[t]$.

k: Velocidad específica de desnaturalización. $[t^{-1}]$.

La dependencia del proceso de desnaturalización con la temperatura está dada por:

$$k = k_o \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) \tag{9.17}$$

de tal manera que la influencia de la concentración de proteína y la temperatura sobre el cambio en la concentración está dado por:

$$\frac{d[P]}{dt} = -\left[k_o \exp\left(\frac{-E}{RT}\right)\right][P] \tag{9.18}$$

donde:

k_o: Constante característica. $[t^{-1}]$.

E: Energía de activación de la desnaturalización. [kJ/mol].

R: Constante de los gases ideales. [kJ/mol−°K].

T: Temperatura. [°K].

Las proteínas tienen energías de activación relativamente altas de tal manera que presentan una variación muy significativa de la velocidad de desnaturalización con la temperatura. El mecanismo de desnaturalización puede involucrar varios pasos, lo importante es determinar cual es la energía de activación del paso más lento o controlante. Por regla general el primer paso es el más lento e involucra el rompimiento de los enlaces que le dan la conformación a la proteína. La Figura 9.11a muestra un diagrama teórico del porcentaje de proteína que permanece estable después de 10 minutos de incubación, cuando la energía de activación es de $E = 400$ kJ mol^{-1}.

La Figura 9.11b muestra un esquema teórico de las posibles curvas de desnaturalización para diferentes enzimas. Cuando la enzima de interés es la P_5, que es estable a temperaturas de hasta 58 °C, si la solución se calienta a 57 °C, se desnaturalizan completamente las enzimas P_1 y P_2 y en grado substancial la P_3 y la P_4. Esto significa que es posible seleccionar una temperatura que produzca

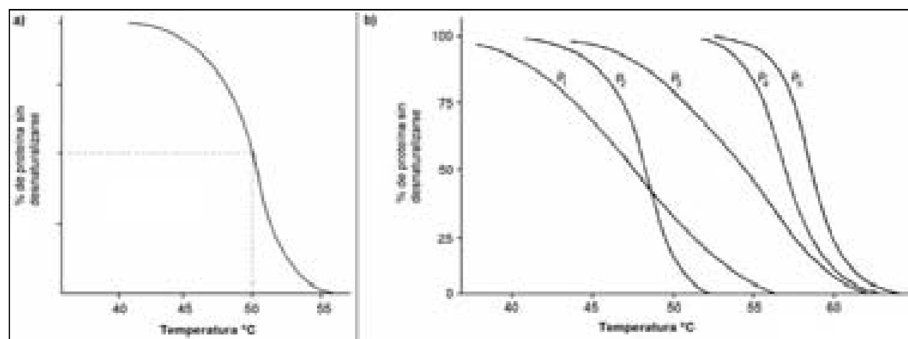


Figura 9.11: a) Diagrama teórico de proteína que permanece estable después de 10 min de incubación, con $E = 400$ kJ mol^{-1}. Fuente: Scopes, 1994. b) Esquema teórico de las posibles curvas de desnaturalización por temperatura de diferentes proteínas. Fuente: Scopes, 1994.

por un lado la desnaturalización completa de una enzima y por otro permita que otra permanezca estable.

La precipitación con temperatura puede ser riesgosa debido a que los daños que se ocasionen a la enzima de interés son irreversibles. La solución se calienta hasta una temperatura dada, se mantiene por un periodo de tiempo a dicha temperatura y enseguida se enfría rápidamente. Por lo tanto, se requiere contar con sistemas de enfriamiento adecuados, sobre todo en tanques agitados, para lograr bajar adecuadamente la temperatura y evitar así que ésta pueda dañar a la proteína de interés. Es conveniente realizar el calentamiento en presencia de sulfato de amonio en la solución, debido a que éste estabiliza las proteínas e inhibe la actividad de las proteasas, que como es sabido se incrementa con la temperatura.

Ejemplo 9.2. Cinética de desnaturalización.

La desnaturalización de una proteína tiene una energía de activación de $400,000$ J/mol. Cuando esta proteína se mantiene a 50 °C por un lapso de 10 min se desnaturaliza en un 50 %.

Se pide:

a) Calcular la constante de la velocidad específica de desnaturalización.

b) Calcular la temperatura a la cual la proteína sólo se desnaturaliza el 10 % en 10 min.

Solución:

a) Constante de velocidad. La forma integrada de la ecuación (9.16) es:

$$\frac{P}{P_o} = \exp(-kt)$$

cuando la desnaturalización es del 50 % la constante k está dada por:

$$k = \frac{-\ln(0.5)}{10 \text{ min}} = 0.0693 \text{ min}^{-1} = 1.155 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

b) Temperatura de desnaturalización en 10 %. De acuerdo a la forma integrada de la ecuación (9.16),

$$\frac{(k)_{323\ ^{o}K}}{(k)_{T_{10\,\%}}} = \frac{\ln(0.5)}{\ln(0.9)} = 6.58$$

combinando el resultado anterior con la ecuación (9.17) se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{(k)_{323\ ^{o}K}}{(k)_{T_{10\,\%}}} &= \exp\left[\left(\frac{E}{R}\right)\left(\frac{323-T}{323\ T}\right)\right] \\ 6.58 &= \exp\left[\left(\frac{400,000\ \dfrac{\text{J}}{\text{mol}}}{8.31\ \dfrac{\text{J}}{\text{mol} - {}^{\circ}\text{K}}}\right)\left(\frac{323-T}{323\ T}\right)\right] \end{aligned}$$

la temperatura es:

$$T_{10\,\%} = 46\ ^{\circ}\text{C}$$

Desnaturalización por pH

Debido a que ciertas proteínas de interés son estables a pH's extremos, se ha utilizado esta propiedad para purificarlas mediante la precipitación por desnaturalización selectiva de sus proteínas contaminantes.

La desnaturalización por pH ocurre tanto por la formación en la molécula de proteína de regiones con cargas iguales que tienden a repelerse, como por el rompimiento de las fuerzas de atracción que le dan su conformación (Fig. 9.12).

La velocidad de desnaturalización a pH's extremos ya sean ácidos o básicos depende del tiempo que tarde la proteína en abrirse y perder su conformación. Este proceso es esencialmente similar al que ocurre en la desnaturalización por temperatura.

Desnaturalización por solventes orgánicos

La estabilidad que presentan algunas proteínas en una solución con solventes orgánicos, es una propiedad que ha sido utilizada en procesos de purificación mediante la precipitación de proteínas contaminantes con estos solventes.

Cuando se utilizan solventes orgánicos como etanol, acetona o cloroformo para desnaturalizar proteínas, la temperatura de la solución se mantiene entre 20 y 30 °C con el fin de acelerar el proceso. Después de un tiempo de incubación

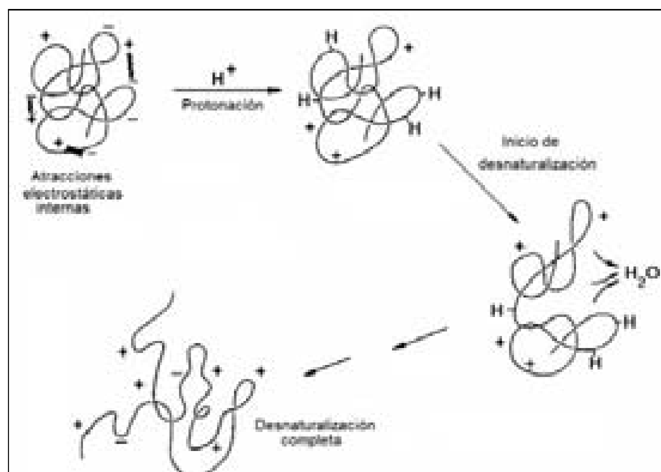


Figura 9.12: Esquema de la desnaturalización de una proteína por efecto del pH. Fuente: Scopes, 1994. Reproducida con el permiso de Springer-Verlag. Copyright ©1994. Todos los derechos reservados.

a esta temperatura la solución se enfría. El aumento de temperatura permite que la cantidad de solvente utilizada sea menor que la empleada en la precipitación convencional de proteínas.

El pH y la temperatura de la solución deben definirse y manejarse cuidadosamente (pues también actúan sobre la proteína de interés) con el fin de maximizar el rendimiento y la pureza de la proteína de interés, y de lograr la máxima precipitación de las proteínas contaminantes.

Una proteína estable en solventes orgánicos es la alcohol deshidrogenasa de levadura. Esta enzima puede ser purificada mediante un tratamiento con 33 % vol/vol de etanol a 25 °C. Este tratamiento permite desnaturalizar las proteínas contaminantes y obtener la deshidrogenasa. En la Figura 9.13 se muestra la desnaturalización de la enzima gliceraldehido fosfato deshidrogenasa con varios alcoholes a una temperatura de 30 °C y un tiempo de incubación de 30 minutos (Scopes, 1994). Puede observarse que la enzima es muy estable en metanol.

9.2.3. Precipitación por Afinidad

La precipitación de proteínas por afinidad es un método de precipitación selectivo que se basa en la capacidad que tienen las proteínas para unirse con ligandos por medio de sus sitios activos (Hilbrig y Freitag, 2003; Mondal *et al.*, 2006). En el caso de la afinidad bioespecífica el ligando puede ser un sustrato, un inhibidor o un anticuerpo. En el caso de pseudoafinidad los ligandos utilizados son colorantes o metales.

La simple adición de ligandos a una solución proteica generalmente no es suficiente para que ocurra la precipitación. Es necesario que el ligando propicie

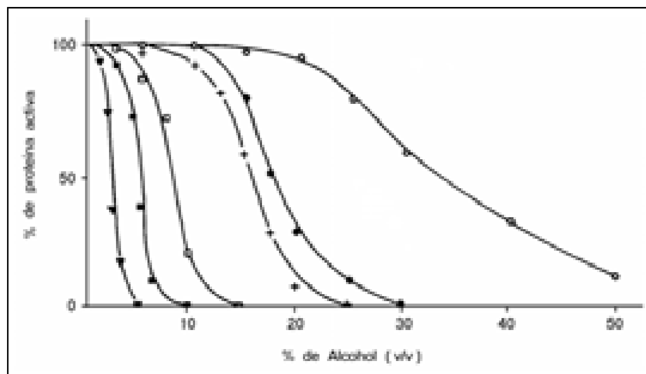


Figura 9.13: Desnaturalización de gliceraldehido fosfato deshidrogenasa: (o) metanol; (●) etanol; (+) 2-propanol; (□) 1-propanol; (■) 1-butanol; (▼) 1-pentanol; . Fuente: Scopes, 1994.

un estado de agregación de los complejos ligando-proteína.

La precipitación por afinidad bioespecífica ocurre sólo cuando el ligando se une con las proteínas o enzimas y forma agregados. El tipo de agregados que se forman depende del tipo de ligando y de la proteína. En la Figura 9.14 se presentan dos sistemas de precipitación por afinidad.

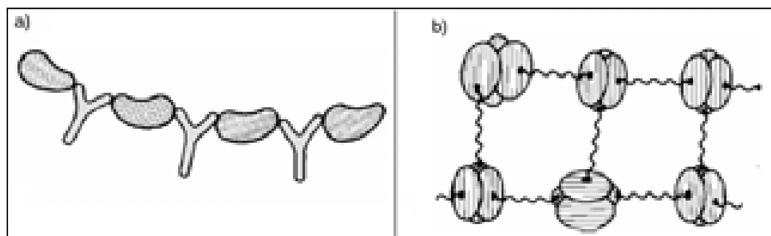


Figura 9.14: Representación esquemática de la formación de agregados por inmunoafinidad y por afinidad. a) Agregado en forma de cadena constituido por un anticuerpo policlonal y una proteína monomérica y b) Agregado en forma de red producido por un anticuerpo policlonal y una proteína tetramérica o por ligandos bis-NAD y una proteína tetramérica. Fuente: Scopes, 1994.

La Figura 9.14a presenta un agregado producido por la unión de un anticuerpo policlonal y una proteína monomérica, llamado inmunoprecipitado. Este tipo de agregados se producen en forma natural en el caso de los sistemas antígeno-anticuerpo. En el caso de que las proteínas sean oligoméricas se originan redes como la que se muestra en la Figura 9.14b.

El principio de precipitación por inmunoafinidad se ha generalizado para el uso de otro tipo de ligandos que no son anticuerpos y que se producen de manera artificial, dando origen a un nuevo enfoque en la precipitación por afinidad al utilizar ligandos bifuncionales Bis-NAD. Estos ligandos se enlazan covalentemente a los sitios activos de las proteínas oligoméricas y forman redes semejantes a la que se muestra en la Figura 9.14b. Esta técnica de precipitación por afinidad ha tenido gran éxito en la precipitación de deshidrogenasas utilizando como precipitante el ligando Bis-NAD. Se ha reportado un rendimiento hasta del 85 % en la recuperación de la enzima lactato deshidrogenasa (Luong *et al.,* 1987). La limitación de este enfoque de la precipitación radica en que se aplica únicamente a proteínas oligoméricas y es necesario llevar a cabo varias pruebas experimentales para determinar cuál es la concentración óptima de bis-ligando a la que ocurre la precipitación de la totalidad de la proteína.

En la Figura 9.15 se muestra un esquema de otro enfoque de la precipitación por afinidad, el cual ya ha sido aplicado a escala industrial. Consiste en sujetar el ligando a un polímero obteniéndose así agentes multifuncionales (macroligandos) que se unen con la proteína de interés y forman agregados. Posteriormente se produce la precipitación del complejo ligando-proteína al agregar sal a la solución o al cambiar el pH de la misma (Janson, 1984).

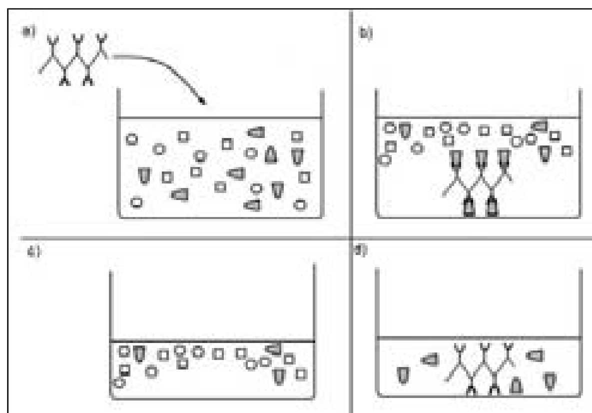


Figura 9.15: Esquema de precipitación por afinidad. a) Adición del macroligando a la solución proteica, b) Formación del complejo ligando-proteína, c) Sobrenadante y d) Recuperación de la proteína purificada.

9.3. Equipo de Precipitación

La operación de precipitación puede realizarse en reactores con las configuraciones ya conocidas: por lotes, tubulares, continuos tipo tanque agitado y continuos compartimentalizados (Fig. 9.16).

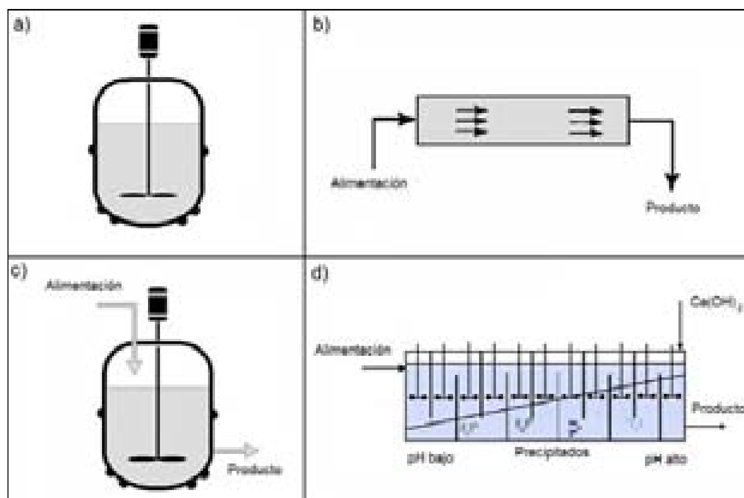


Figura 9.16: Tipos de reactores utilizados en la precipitación de proteínas. a) Intermitente, b) Tubular, c) Continuo tipo tanque agitado y d) Continuo compartimentalizado.

9.4. Diseño de Precipitadores

En el diseño de un proceso de precipitación debe tomarse como base el comportamiento cinético de las partículas en solución. El conocimiento de este comportamiento permite hacer la selección adecuada de la geometría en que se realizará el proceso. Con base a lo anterior, esta sección se enfoca a dos aspectos:

- Cinética de la Precipitación.
- Diseño del Precipitador.

9.4.1. Cinética de la Precipitación

La precipitación de proteínas puede efectuarse ya sea desnaturalizando o sin desnaturalizar éstas. En este apartado se revisan los aspectos cinéticos relacionados con la precipitación sin que ocurra desnaturalización de la proteína.

En una solución proteica las moléculas presentan por efecto de su energía cinética un movimiento al azar que produce choques entre sí. Para que las moléculas de proteína queden asociadas al chocar se requiere eliminar tanto las barreras producidas por las moléculas de agua que las rodean, como las que originan sus cargas eléctricas.

Para facilitar su estudio la cinética de la precipitación se divide en las seis fases siguientes:

1. Mezclado inicial: la solución proteica se mezcla con el agente precipitante para eliminar las barreras.

2. Nucleación: al disminuir la solubilidad de la proteína se inicia la precipitación al formarse en el seno de la solución pequeñas partículas (núcleos).

3. Crecimiento limitado por difusión (crecimiento percinético): en esta fase los núcleos van creciendo conforme la proteína difunde del seno de la solución hasta los núcleos. La frecuencia de las colisiones está limitada por la velocidad de difusión de las moléculas y no por el mezclado. Se forman las partículas primarias de tamaño entre 0.1 y 10 μm.

4. Crecimiento inducido por el esfuerzo de corte (crecimiento ortocinético): el mezclado favorece el crecimiento del agregado formándose partículas en el rango de 1 a 100 μm.

5. Floculación: los agregados se juntan formando los grandes flóculos.

6. Separación: los flóculos se remueven de las solución mediante un método de separación sólido-líquido como la centrifugación.

Mezclado inicial

Una vez que se agrega el agente precipitante (sal, solvente o polímero no iónico) a la solución de proteínas, se requiere que éste se difunda rápidamente para obtener una mezcla homogénea. Es importante promover los choques entre el producto y el agente precipitante lo más rápido posible.

El tiempo requerido para obtener una mezcla homogénea en un tanque bien agitado esta dado por:

$$t = \frac{l^2}{4D} \tag{9.19}$$

donde:

D: Coeficiente de difusión. [cm^2/s].

l: Diámetro promedio de los remolinos ocasionados por la agitación. [cm].

De acuerdo a la teoría de difusión de remolinos de Kolmogoroff el diámetro de éstos está dado por:

$$l = \left(\frac{\rho\nu^3}{P/V}\right)^{1/4} \tag{9.20}$$

donde:

ρ: Densidad de la solución. [g/cm^3].

ν: Viscosidad cinemática. [cm^2/s].

P/V: razón de potencia por unidad de volumen del sistema de agitación. [HP/cm^3].

Combinando las ecuaciones (9.19) y (9.20) se pueden estimar tiempos de mezclado mediante parámetros del sistema. Este tiempo es una medida del tiempo necesario para obtener una mezcla homogénea y de inicio de la precipitación.

Nucleación

Durante la nucleación se producen partículas de tamaño ultramicroscópico una vez que la mezcla se sobresatura. En esta fase del proceso se inicia la formación de las pequeñas partículas de precipitado (núcleos) que aparecen después de agregar el agente precipitante. En algunos casos como en los sistemas coloidales esta etapa es instantánea, por lo que el tiempo en que esto ocurre puede despreciarse. En esta etapa las partículas de precipitado se encuentran dispersas en el líquido.

Crecimiento limitado por difusión o crecimiento pericinético.

El crecimiento de las partículas formadas durante la nucleación está limitado por la difusión mientras las partículas no alcanzan un tamaño característico definido por el movimiento del fluido. Este tamaño varía entre 0.1 y 10.0 μm para esfuerzos de corte altos y bajos, respectivamente.

En esta fase la velocidad inicial con que disminuye la concentración de partículas de soluto (de igual tamaño) suspendidas en el seno del líquido, puede ser descrita de acuerdo a la teoría de Smoluchowski por una ecuación de segundo orden:

$$-\frac{dy_i}{dt} = ky_i^2 \tag{9.21}$$

donde:

y_i: Concentración de partículas de soluto i en el tiempo t. [mol/L].

t: Tiempo. [s]

k: Constante del proceso. [L/mol−s].

Considerando un tiempo de nucleación instantáneo la integración de la ecuación (9.21) conduce a:

$$\frac{1}{y_i} - \frac{1}{y_{io}} = kt \tag{9.22}$$

donde y_{io} es la concentración inicial de partículas de soluto i.

La ecuación (9.22) describe una recta con ordenada al origen $1/y_{io}$ y pendiente k.

Debido a que es difícil medir la concentración y_i la ecuación (9.22) puede escribirse en términos del peso molecular promedio del precipitado utilizando un balance de masa. Esto es:

$$y_i\bar{M} = y_{io}\bar{M}_o \tag{9.23}$$

combinando las ecuaciones (9.22) y (9.23), se puede obtener la siguiente expresión:

$$\bar{M} = \bar{M}_o (1 + y_{io} k t) \tag{9.24}$$

donde:

$\bar{M}_o$: Peso molecular inicial de las partículas de precipitado.

$\bar{M}$: Peso molecular promedio de las partículas de precipitado.

La ecuación (9.24) se representa gráficamente en la Figura 9.17. La ordenada al origen es $\bar{M}_o$ y el valor de la pendiente está dada por $\left(\bar{M}_o y_{io} k\right)$. Si se conocen y_{io} y $\bar{M}_o$ puede estimarse k.

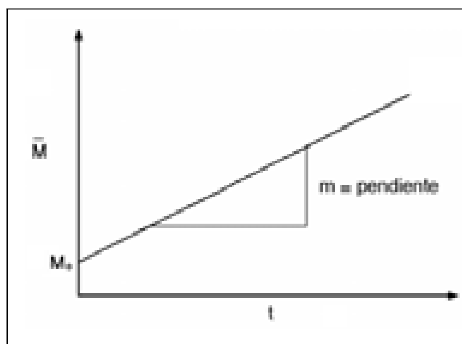


Figura 9.17: Representación esquemática de $\bar{M}$ vs t para determinar experimentalmente el valor de la constante k.

La constante k del crecimiento pericinético, de acuerdo con la teoría de Smoluchowski, sólo depende de la difusividad y el diámetro de la molécula de soluto que se adhiere a las partículas. De aquí que esta etapa esté limitada por la velocidad de difusión. De acuerdo a esta teoría k está dada por:

$$k = 8\pi D d N \tag{9.25}$$

donde:

d es el diámetro de la molecula de soluto; D, es el coeficiente de difusión; y N, es el número de Avogadro.

El valor del coeficiente de difusión de la ecuación anterior es un valor promedio de todas las partículas en el sistema, de tal forma que a medida que la partícula crece, el valor del coeficiente de difusión disminuye. De acuerdo a la ecuación (9.25) aún cuando esto suceda, el valor de la constante no se altera pues la disminución en D tiene como causa un incremento en la misma proporción del diámetro de la partícula d, de tal manera que el producto Dd permanece constante, y en consecuencia k permanece constante. Es decir, la determinación experimental de k puede ser aplicada a diversos sistemas.

Generalmente el tiempo de formación de las partículas primarias es mucho menor que el tiempo global del proceso de precipitación.

Crecimiento inducido por esfuerzo de corte o agregación ortocinética

La difusión puede limitar el crecimiento de partículas pequeñas, pero es menos importante en el crecimiento de partículas grandes. En el proceso de precipitación cuando se agita una suspensión de partículas cuyo diámetro es mayor que 1.0 μm aproximadamente, el movimiento del fluido provocará que las partículas choquen y formen agregados. Estos choques también pueden ocasionar rompimiento de los agregados. El crecimiento de las partículas estará limitado tanto por el movimiento del fluido como por la concentración de partículas.

En una suspensión agitada de partículas esféricas de tamaño uniforme d_p, la velocidad inicial con que disminuye la concentración de esas partículas debido a los choques que forman agregados, está dada por:

$$-\frac{dy_i}{dt} = k^{'} y_i^2 \tag{9.26}$$

Idealmente la ecuación anterior debería incluir un término para tomar en cuenta el crecimiento pericinético. Sin embargo, dicho término se hace menos importante conforme aumenta el tamaño de las partículas.

La constante $k^{'}$ de la ecuación (9.26) está dada por:

$$k^{'} = \frac{2}{3}\alpha N d_p^3 \left[\frac{P/V}{\rho\nu}\right]^{1/2} \tag{9.27}$$

en esta ecuación α representa un coeficiente que indica la eficiencia del choque, es decir, indica la frecuencia con que un choque da lugar a un agregado. Este coeficiente puede ser estimado estudiando la velocidad con que decrece el número de partículas durante el crecimiento ortocinético. El término entre paréntesis cuadrados es una medida del esfuerzo de corte promedio para flujos isoentrópicos turbulentos.

Si se sustituye la expresión de $k^{'}$ en la ecuación (9.26) se obtiene:

$$-\frac{dy_i}{dt} = \left[\frac{2}{3}\alpha N d_p^3 \left(\frac{P/V}{\rho\nu}\right)^{1/2}\right] y_i^2 \tag{9.28}$$

En la ecuación (9.28) el diámetro d_p de las partículas depende del tiempo, por lo que para su integración se considera una fracción constante ψ de volumen de partículas del soluto a volumen de la solución. Esta fracción esta dada por:

$$\psi = \left(\frac{\pi d_p^3}{6}\right) y_i N \tag{9.29}$$

Despejando d_p^3 de la ecuación anterior y sustituyendo en la ecuación (9.28), se obtiene una ecuación en la cual no está involucrado el diámetro de las partículas y es:

$$-\frac{dy_i}{dt} = \left[\frac{4\alpha\psi}{\pi} \left(\frac{P/V}{\rho\nu}\right)^{1/2}\right] y_i \tag{9.30}$$

finalmente, integrando la ecuación (9.30) se tiene:

$$\frac{y_i}{y_{io}} = \exp\left\{-\left[\frac{4\alpha\psi}{\pi}\left(\frac{P/V}{\rho\nu}\right)^{1/2}\right]t\right\} \tag{9.31}$$

donde y_{io} es la concentración inicial de partículas bajo las consideraciones del modelo.

En un proceso de precipitación en el cual el crecimiento de las partículas está limitado por el flujo, el cambio en la concentración de éstas tiene un decaimiento exponencial.

Para determinar el coeficiente de eficiencia de colisión α, debe considerarse que éste depende no sólo del tamaño de las partículas sino también de la velocidad de corte del fluido. Lo anterior se debe a que dos partículas que aparentemente pueden ir directo a una colisión, tienden a seguir las líneas de corriente del fluido con lo que disminuye la probabilidad de la colisión.

Floculación

La aglomeración o floculación de las partículas de precipitado es la última fase del proceso de precipitación.

Durante la agregación ortocinética el crecimiento es función directa del mezclado. Sin embargo, este mismo mezclado puede causar el rompimiento de los flóculos formados. Debido a lo anterior la fase de floculación generalmente se realiza a bajas velocidades de agitación y en ocasiones sin agitación, proceso conocido como envejecimiento del precipitado.

La floculación espontánea de la suspensión puede ser estimulada por la adición de agentes floculantes, en este caso la velocidad de floculación dependerá del mezclado del agente con la solución de proteínas, de la velocidad de difusión y de la unión del agente floculante a la superficie de la molécula de proteína. Todas estas etapas determinan el tiempo de espera antes de que la floculación comience. Estos aspectos deben tomarse en consideración en el diseño del precipitador.

Separación

Una vez que los flóculos alcanzan un diámetro apropiado se remueven de la solución mediante un método de separación sólido-líquido como la centrifugación. El uso de esta operación requiere que los flóculos sean de tamaño adecuado y estables.

9.4.2. Métodos de Diseño

El proceso de crecimiento de las partículas en la precipitación puede estar limitado por varios mecanismos. Aun cuando hay pocos datos para definir la relación que existe entre las condiciones de mezclado inicial y el tamaño de partícula, puede suponerse que para proteínas que precipitan rápidamente, la velocidad de mezclado de los reactantes afectará el tamaño inicial de la partícula

y las características de su crecimiento posterior. De tal manera que en el diseño del precipitador deben tenerse muy en cuenta las condiciones de mezclado en las que se realizará la precipitación, existiendo dos arreglos básicos: a) precipitador por lotes y b) precipitador continuo.

Precipitador por lotes

En un precipitador por lotes la proteína está expuesta a un rango de condiciones creadas por el agente precipitante durante el tiempo en que éste se agrega a la solución, entonces las condiciones iniciales de precipitación del material son diferentes a las condiciones finales. Para disminuir este efecto el agente precipitante debe agregarse lentamente y bien dispersado.

En un precipitador por lotes todas las partículas son sometidas a fuerzas de corte similares, y cuando éstas son controladas, se producen partículas primarias más grandes que las obtenidas en los precipitadores tubulares.

A nivel laboratorio es muy usado el precipitador por lotes que consiste en un tubo de ensayo que se agita en vortex por un corto tiempo inmediatamente después de agregar el agente precipitante. Posteriormente se deja en reposo toda la noche. Otro arreglo básico es el vaso de precipitados agitado magnéticamente (Chan *et al.,* 1986).

En el escalamiento de un proceso de precipitación lo que interesa es que la cinética que se observa a nivel laboratorio sea la misma que la que se presente a gran escala. Cuando la velocidad de crecimiento pericinético es alta con respecto a la velocidad del proceso global de precipitación, como generalmente es el caso de la precipitación de proteínas, las ecuaciones (9.20) y (9.31) establecen que la cinética de precipitación a nivel laboratorio y a gran escala será la misma siempre que la razón P/V permanezca constante entre ambas escalas, dado que la densidad de la solución ρ, la viscosidad cinemática ν, α y ψ no cambian con la escala.

Ejemplo 9.3. Precipitación de Caseína.

La caseína-α de bovino es una proteína que precipita en presencia de cloruro de calcio a concentraciones 0.008 M. Se va a precipitar caseína a partir de una solución que presenta una densidad ρ_s de 1.032 g/cm^3 y una viscosidad cinemática ν de 0.01 cm^2/s. El proceso se va a realizar en un tanque agitado con una potencia P de 1.0 HP y un volumen V de 1,000 L.

La concentración de la caseína en la solución alimentada y_{io} es de 0.1 g/L. El peso molecular de la caseína-α es de 27,000 Da, la densidad del precipitado ρ_p medida a nivel laboratorio es de 1.367 g/cm^3, el diámetro, d, es de 0.002×10^{-4} cm y el coeficiente de difusión, D, es de 8.5×10^{-7} cm^2/s. Se estima que el coeficiente de aglomeración α tiene un valor de 0.08 y que el tiempo en que se realiza la nucleación es instantáneo.

Se pide estimar:

a) El tiempo en que el crecimiento está limitado por la difusión y la concentración de partículas al final de este tiempo.

b) El tiempo para alcanzar un tamaño de partícula de 50 μm.

Solución:

Se tienen los siguientes datos:

$\rho_s = 1.032$ g/cm^3
$\rho_p = 1.367$ g/cm^3
$\nu = 0.01$ cm^2/s
$P = 1.0$ HP$= 746 \times 10^7$ g–cm^2/s^3
$V = 1000$ L
$y_{io} = 0.1$ g/L
$M = 27,000$ Da
$d = 0.002 \times 10^{-4}$ cm
$D = 8.5 \times 10^{-7}$ cm^2/s
$\alpha = 0.08$

a) El tiempo requerido para un mezclado homogéneo está dado por la ecuación (9.19). El tiempo t corresponde al tiempo en el cual el crecimiento está limitado por la difusión. Combinando las ecuaciones (9.19) y (9.20) y sustituyendo valores se tiene:

$$t = \left(\frac{1}{4D}\right)\left(\frac{\rho\nu^3}{P/V}\right)^{1/2}$$

$$t = \left[\frac{1}{4\left(8.5\times 10^{-7}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}\right)}\right]\left[\frac{\left(1.032\ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)\left(0.01\ \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}\right)^3}{\left(\frac{746\times 10^7\ \frac{\text{g}-\text{cm}^2}{\text{s}^3}}{10^6\ \text{cm}^3}\right)}\right]^{1/2}$$

$$t = 3.46\ \text{s}$$

La concentración de partículas y_i al final de este tiempo se determina combinando las ecuaciones (9.22) y (9.25) para obtener:

$$\frac{1}{y_i} = \frac{1}{y_{io}} + (8\pi D d N)t$$

de tal manera que:

$$\frac{1}{y_i} = \left(\frac{27,000\ \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{0.1\ \frac{\text{g}}{10^3\ \text{cm}^3}}\right) + 8\pi\left(8.5\times 10^{-7}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}\right)$$
$$(0.002\times 10^{-4}\text{cm})\times\left(6.02\times 10^{23}\frac{1}{\text{mol}}\right)(3.46\ \text{s})$$
$$\frac{1}{y_i} = \frac{1}{3.7\times 10^{-9}\ \frac{\text{cm}^3}{\text{mol}}} + 8.9\times 10^{12}\ \frac{\text{cm}^3}{\text{mol}}$$

entonces,

$$y_i = 1.12\times 10^{-13}\ \frac{\text{mol}}{\text{cm}^3}$$

La concentración final es mucho menor que la inicial.

b) El tiempo necesario para obtener partículas de 50 μm de diámetro está dado por la ecuación (9.31):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{y_i}{y_{io}}\right)}{\left(\frac{4\alpha\psi}{\pi}\right)\left(\frac{P/V}{\rho\nu}\right)^{1/2}} \qquad \text{(A)}$$

de acuerdo al balance expresado en la ecuación (9.23),

$$\frac{y_i}{y_{io}} = \frac{\bar{M}_o}{\bar{M}}$$

y el peso molecular promedio $\bar{M}$ de las partículas de 50 μm es:

$$\bar{M} = \rho N\left(\frac{\pi d^3}{6}\right)$$
$$\bar{M} = \left(1.367\ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)\left(6.023\times 10^{23}\ \frac{\text{partículas}}{\text{mol}}\right)\left[\frac{\pi\left(50\times 10^{-4}\right)^3}{6}\right]\ \frac{\text{cm}^3}{\text{partícula}}$$
$$\bar{M} = 5.39\times 10^{16}\ \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

entonces,

$$\frac{y_i}{y_{io}} = \frac{27,000\ \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{5.39\times 10^{16}\ \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 5\times 10^{-13}$$

la fracción de volumen de soluto en la solución es:

$$\psi = \frac{\dfrac{1}{1.367}\ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{g}}}{\dfrac{10^3}{0.1}\ \dfrac{\text{cm}^3}{\text{g}}} = 7.31 \times 10^{-5}$$

sustituyendo estos valores en la ecuación (A) anterior se tiene:

$$t = \frac{-\ln(5 \times 10^{-13})}{\left(\dfrac{4 \times 0.08 \times 7.31 \times 10^{-5}}{\pi}\right)\left(\dfrac{746 \times 10^7\ \dfrac{\text{g} - \text{cm}^2}{\text{s}^3}}{10^6\ \text{cm}^3 \times 1.032\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 0.01\ \dfrac{\text{cm}^2}{\text{s}}}\right)^{1/2}}$$

$$t = 4,474\ \text{s}$$

el paso controlante en esta precipitación es el crecimiento ortocinético.

Precipitadores continuos

En un reactor tubular cuando se tiene un buen mezclado en el punto donde se agrega el agente precipitante, la proteína se ubica rápidamente a las condiciones finales en que ocurre la precipitación. Las fuerzas de corte a las que están sujetas las partículas pueden ser las que produce el flujo laminar, aun cuando la velocidad media de corte puede exceder a la de un tanque agitado.

En un reactor continuo tipo tanque agitado la proteína es puesta en contacto instantáneamente con el agente precipitante, alcanzándose al mismo tiempo las condiciones finales de precipitación. Las condiciones de corte son muy parecidas a las de un precipitador por lotes, y las partículas estarán sujetas a las fuerzas de corte durante el tiempo de residencia en el reactor (Glatz, 1990).

La Figura 9.18 muestra la influencia del tipo de reactor sobre la curva de insolubilización por salado de la fumarasa (Bell *et al.,* 1983). Puede observarse que existe un desplazamiento en la curvas, que puede ser debido a diferencias locales en el pH, provocadas por la forma como se agrega el sulfato de amonio. El mismo corrimiento se observa cuando hay variación en el grado de mezclado en un tanque agitado.

Los resultados anteriores sugieren que un factor importante a considerar en el diseño del reactor, es la agitación que se proporciona a la solución en la que se encuentra la proteína de interés. Esto es particularmente importante cuando se desea escalar el proceso debido a la relación que hay entre potencia y agitación.

Para visualizar el diseño de precipitadores continuos, se puede partir de un sistema sencillo donde se cuenta con una suspensión diluida (< 20 g/L) y velocidades de agitación moderadas, de tal manera que el rompimiento de los agregados pueda ser despreciado (Rohani y Chen, 1993). Bajo estas condiciones es posible utilizar balances poblacionales para derivar expresiones de las velocidades de nucleación, crecimiento y agregación a partir de datos experimentales. Las correlaciones empíricas que se obtienen son de la siguiente forma:

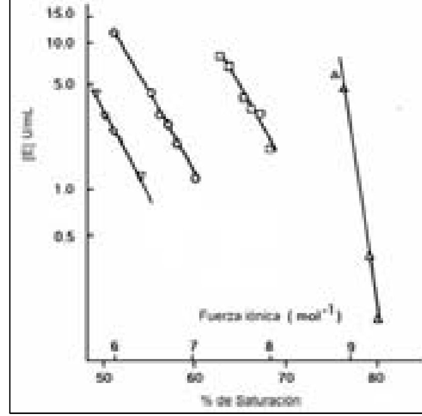


Figura 9.18: Influencia del tipo de contacto sobre la curva de insolubilización por salado de fumarasa. (∇) contacto intermitente con sulfato de amonio sólido; ($\circ$) contacto intermitente con solución saturada de sulfato de amonio; ($\square$) contacto continuo $\tau = 96$ s , $V = 0.38$ L y solución saturada de sulfato de amonio; ($\triangle$) contacto continuo $\tau = 918$ s, $V = 1.87$ L y solución saturada de sulfato de amonio. Bell *et al*, 1983.

$$B^o = k_B \exp\left(\frac{-E_b}{RT}\right)\sigma^a I^b \omega^c \tau^d \tag{9.32}$$

$$G = k_G \exp\left(\frac{-E_G}{RT}\right)\sigma^e I^f \omega^g \tau^h \tag{9.33}$$

$$I_{agg} = k_A \exp\left(\frac{-E_A}{RT}\right)\sigma^p I^q \omega^r \tau^s \tag{9.34}$$

donde:

B^o: Velocidad de nucleación. [número de núcleos/L$-$h].

G: Velocidad de crecimiento pericinético. [μm/h].

I_{agg}: Índice de agregación. Medida del crecimiento ortocinético. [adim.].

k_B, k_G y k_A: Constantes cinéticas. [unidades consistentes].

E_B, E_G y E_A: Energías de activación. [kJ/mol].

σ: Sobresaturación aparente.

I: Fuerza iónica. [mol/L].

ω: Velocidad de agitación. [rpm].

τ: Tiempo de residencia promedio. [h].

a, b, c, d, e, f, g, h, p, q, r, s: constantes empíricas.

A su vez el índice de agregación está dado por:

$$I_{agg} = 1 - \frac{N_p}{N_u} \tag{9.35}$$

donde:

N_p: número de partículas por unidad de volumen en el precipitado. [núm/L^3].

N_u: número de partículas formadas por nucleación en un tiempo de residencia. [núm/L^3].

Cuando la agregación es total el índice toma el valor de uno, cuando no existe agregación el índice toma el valor de cero.

La definición de sobresaturación en un proceso de precipitación es compleja. En el caso de una precipitación continua la sobresaturación puede definirse como:

$$\sigma = \frac{C_e - C_s}{C_e} \tag{9.36}$$

donde C_e y C_s son las concentraciones proteicas a la entrada y salida del precipitador.

Ejemplo 9.4. Precipitación isoeléctrica de proteínas de una oleaginosa.

En el estudio cinético de la precipitación de proteína a partir de una solución obtenida de una pasta de una semilla oleaginosa, se obtuvieron las correlaciones empíricas siguientes:

$$\begin{aligned}
B^o &= 4.8 \times 10^{16} \left[\exp\left(\frac{-16540}{RT}\right)\right] \sigma^{5.723} I^{-0.1} \omega^{0.905} \tau^{-0.215} \\
G &= 0.7 \left[\exp\left(\frac{-2860}{RT}\right)\right] \sigma^{0.67} I^{-0.091} \omega^{0.625} \tau^{-0.833} \\
I_{agg} &= 1.2 \left[\exp\left(\frac{-470}{RT}\right)\right] \sigma^{0.007} I^{-0.003} \omega^{0.004} \tau^{0.008}
\end{aligned}$$

Se pide estimar:

a) La velocidad de nucleación, la velocidad de crecimiento y el índice de agregación cuando la precipitación se efectúa a las condiciones siguientes: $\sigma = 0.6246$, $\tau = 0.048$ h, $\omega = 270$ rpm, $I = 0.027$ mol/L y $T = 295$ °K.

b) El número de partículas por unidad de volumen en el precipitado.
Solución:
a) Aplicando las correlaciones correspondientes se tiene:

$$\begin{aligned} B^o &= 4.8 \times 10^{16} \left[\exp\left(\frac{-16540 \ \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}}{8.314 \ \frac{\text{kJ}}{\text{mol} -^o \text{K}} \times 295 \ ^\circ\text{K}} \right) \right] \\ & \quad \left[(0.6246)^{5.723} (0.027)^{-0.1} (270)^{0.905} (0.048)^{-0.215} \right] \\ B^o &= 1.67 \times 10^{15} \ \frac{\text{num}}{\text{L} - \text{h}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} G &= 0.7 \left[\exp\left(\frac{-2860 \ \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}}{8.314 \ \frac{\text{kJ}}{\text{mol} - ^\circ\text{K}} \times 295 \ ^\circ\text{K}} \right) \right] \\ & \quad \left[(0.6246)^{0.67} (0.027)^{-0.091} (270)^{0.625} (0.048)^{-0.833} \right] \\ G &= 93.3 \ \frac{\mu\text{m}}{\text{h}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} I_{agg} &= 1.2 \left[\exp\left(\frac{-470 \ \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}}{8.314 \ \frac{\text{kJ}}{\text{mol} - \ ^\circ\text{K}} \times 295 \ ^\circ\text{K}} \right) \right] \\ & \quad \left[(0.6746)^{0.007} (0.027)^{-0.003} (270)^{0.004} (0.048)^{0.008} \right] \\ I_{agg} &= 0.99 \end{aligned}$$

b) De acuerdo a la ecuación que define al índice de agregación,

$$\begin{aligned} N_p &= B^o \tau (1 - I_{agg}) \\ N_p &= \left(1.67 \times 10^{15} \ \frac{\text{núm}}{\text{L} - \text{h}} \right) (0.048 \ \text{h}) \, (1 - 0.99) \\ N_p &= 8.016 \times 10^{11} \ \frac{\text{núm}}{\text{L}} \end{aligned}$$

9.5. Sumario

La precipitación es una operación empleada tanto para la concentración como para la purificación de soluciones de biomoléculas.

Existen varias formas de realizar una operación de precipitación, dependiendo del tipo de agente precipitante que se utilice y el principio que se emplee. La precipitación puede realizarse por disminución de la solubilidad, por desnaturalización selectiva y por afinidad. Los equipos empleados en la precipitación pueden ser intermitentes o continuos en diseños convencionales. El diseño de estos equipos se realiza mediante una combinación de experimentos y modelos cinéticos.

9.6. Problemas

9.1. Parámetros de precipitación. En la precipitación de alcohol deshidrogenasa con sulfato de amonio utilizando un volumen de 30 mL, en determinaciones realizadas en el sobrenadante se obtuvieron los resultados siguientes:

% de Saturación $(NH_4)_2SO_4$	**Actividad** Específica	**Proteína** total (mg)
50	180,000	29.80
45	200,000	21.28
40	650,000	17.87
35	440,000	8.65
25	430,000	23.87

Se pide: Obtener los parámetros A y m de la curva de precipitación para la actividad de la enzima en U/mL.

Resp. $A = 5.7$ y $m = -0.244$

9.2. Cinética de desnaturalización proteica. Una proteína se desnaturaliza el 50 % cuando se calienta a 50 °C por 10 min.

Se pide: Estimar el tiempo de calentamiento para que la desnaturalización sea sólo del 10 %.

Resp. 1.51 min.

9.3 Purificación proteica. Una solución de 80 L contiene 12.8 g/L de una proteína de interés (IN) y 1.8 g/L de una proteína contaminante (CO). Las constantes de precipitación son $\beta_{IN} = 6.32$, $k_{IN} = 1.1$, $\beta_{CO} = 6.64$ y $k_{CO} = 0.95$. Se desea recuperar el 98 % de proteína por precipitación con sulfato de amonio.

Se pide calcular:

a) La masa inicial de proteína de interés en la solución.

b) Masa de proteína que permanece en solución después de recuperar el 98 %.

c) La fuerza iónica necesaria del sulfato de amonio.

d) La molaridad del sulfato de amonio.

e) La cantidad de proteína contaminate precipitada.

f) La pureza del precipitado

Resp. a) 1024 g, b) 20.48 g, c) 7.29 y d) 2.43 M.

9.7. Bibliografía

Bell, D.J.; Hoare, M.; Dunnill, P. **1983**. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. En: *Downstream Processing. Advances in Biochemical Engineering*. Springer-Verlag. New York. 26, 1-72.

Chan, M.Y.Y.; Hoare, M.; Dunnill, P. **1986**. The kinetics of protein precipitation by different reagents. *Biotech. Bioeng.* 27, 387-393.

Cheng, Y.; Lobo, R.F.; Sandler, S.I.; Lenhoff, A.M. **2006**. Kinetics and equilibria of lysozyme precipitation and crystallization in concentrated ammonium sulfate solutions. *Biotech. Bioeng.* 94, 177-188.

Clark, W.M. **1989**. Thermodynamics of protein partitioning in aqueous two phase system. En: *Chemical Engineering Problems in Biotechnology.* Shuler, M.L. (Ed.). AIChE. New York. 147-179.

Foster, P.R.; Dunnill, P.; Lilly, M.D. **1973**. The precipitation of enzimes from cell extracts of Saccharomyces cerevisiae by polyethylene glycol. *Biochem. Biophys. Acta.* 317, 505-516.

Glatz, C.E. **1990**. Precipitation. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 329-356.

Guo, R.; Guo, M.; Narsimhan, G. **1996**. Thermodynamics of precipitation of globular proteins by nonionic polymers. *Ind. Eng. Chem. Res.* 35, 3015-3026.

Hilbrig, F.; Freitag, R. **2003**. Protein purification by affinity precipitation. *J. Chromatogr. B.* 790, 79-90.

Janson, J. **1984**. Large-scale affinity purification. State of the art and future prospects. *Trends Biotech.* 2, 31-38.

Juckes, I.R.M. **1971**. Fractionation of proteins and viruses with polyethylene glycol. *Biochem. Biophys. Acta.* 229, 535-546.

Luong, J.H.T.; Nguyen, A.L.; Male, K.B. **1987**. Recent developments in downstream processing based on affinity interactions. *Tibtech.* 5, 281-286.

McDonald, P.; Victa, C.; Carter-Franklin, J.N.; Fahrner, R. **2009**. Selective antibody precipitation using polyelectrolytes: a novel approach to the purification of monoclonal antibodies. *Biotech. Bioeng.* 102, 1141-1151.

Mondal, K.; Gupta, M.N.; Roy, I. **2006**. Affinity-Based Strategies for protein purification. *Anal. Chem.* 78, 3499-3504.

Rohani, S.; Chen, M. **1993**. Aggregation and precipitation kinetics of canola protein by isoelectric precipitation. *Canad. J. Chem. Eng.* 71, 689-698.

Salcedo-Chávez, B.; Osuna-Castro, J.A.; Guevara-Lara, F.; Domínguez-Domínguez, J.; Paredes-López, O. **2002**. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6515-6520.

Scopes, R. **1994**. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag. New York. 3, 41-71.

Capítulo 10

Ultrafiltración

10.1. Introducción

La ultrafiltración (UF) es una operación que emplea membranas especiales en diferentes tipos de arreglos para separar macromoléculas en solución de contaminantes más pequeños, por medio de un gradiente de presión.

La ultrafiltración es utilizada en la etapa de purificación de caldos biológicos. En esta etapa los caldos sujetos a purificación contienen al soluto de interés en forma más concentrada y pura que el caldo original, debido a ésto los volúmenes a tratar son menores que los correspondientes a las primeras etapas del proceso.

Para describir un proceso de membrana es necesario poder establecer el movimiento relativo de los componentes de la mezcla a través de la membrana, causado por la fuerza originada por el gradiente de presión. Generalmente se realiza una descripción fenomenológica donde la membrana se considera como una caja negra, es decir, el mecanismo microscópico de flujo (y rechazo) no es explicado en este enfoque. Este tratamiento es característico del enfoque de los fenómenos de transporte.

La ultrafiltración forma parte de un conjunto de operaciones con membranas que son empleadas en diferentes etapas de los procesos de bioseparación. Es importante hacer notar que los principios básicos de estas operaciones son comunes.

En la sección 10.2 de este capítulo se efectúa una descripción general de los diferentes procesos con membranas existentes con el propósito de establecer las principales similitudes y diferencias de éstos con respecto a la ultrafiltración. Se resalta la importancia que tiene la operación en flujo tangencial para este tipo de sistemas. Se presenta también en esta sección la teoría de la ultrafiltración que permite analizar el efecto de los diversos parámetros sobre el comportamiento de esta operación. En la sección 10.3 se describen las características más importantes de los principales equipos utilizados en los procesos con membranas. La sección 10.4 presenta los fundamentos del diseño de equipos de UF haciendo énfasis en el cálculo de áreas y tiempo de UF de dichos sistemas. Se presenta una discusión sobre las condiciones óptimas de operación de un sistema en el

marco de la mecánica de fluidos y los esquemas de operación más frecuentes en los sistemas de UF.

10.2. Fundamentos

Para el tratamiento de la operación de UF es conveniente establecer primero el marco donde se desarrolla. Asimismo, es conveniente revisar los fundamentos teóricos de la operación que facilitan su uso y correcta aplicación. En este sentido, esta sección hace énfasis en tres aspectos:

- Los procesos con membranas.
- Flujo cruzado o tangencial.
- La teoría de UF.

10.2.1. Procesos con Membranas

Actualmente existen varios procesos que emplean una membrana para lograr una separación dada (Mc Gregor, 1986). Estos procesos se pueden caracterizar en forma general con base: a) la fuerza impulsora del proceso, b) el tipo de membrana que emplean y c) el rango de tamaño de partícula que retienen sus membranas.

De acuerdo al tipo de fuerza impulsora los principales procesos con membranas (Tabla 10.1) se pueden clasificar de la siguiente forma:

Gradiente de presión

Ultrafiltración (UF).
Microfiltración (MF).
Ósmosis Inversa (OI).

Gradiente de concentración

Diálisis (D).

Gradiente de Voltaje

Electrodiálisis (ED).

El tipo de membrana puede ser microporosa convencional o anisotrópica (Fig. 10.1). Estas son las más utilizadas en UF debido a que las membranas microporosas convencionales poseen una estructura tortuosa que provoca retención irreversible de partículas dentro de la matriz, lo que dificulta su limpieza y reuso. Las membranas anisotrópicas tiene dos capas características: una película delgada y densa de $0.1 - 1.5$ μm de espesor y bajo la película una subestructura microporosa de $0.1 - 1.0$ mm que presenta aberturas progresivamente mayores (en forma de v), que facilitan el paso del solvente y los solutos que logran pasar la película. En el caso de las membranas tipo composite se utilizan dos tipos de materiales para formar la membrana anisotrópica.

Tabla 10.1: Principales características de los procesos con membranas.

			MF	UF	OI	D
Fuerza impulsora			ΔP	ΔP	ΔP	ΔC
Presión de operación (kPa)			100-500	100-500	700-20,000	-
Tipo de membrana			Micro-porosa Simétrica	Micro-porosa Asimétrica	Semiper-meable Asimétrica	Diálisis Simétrica
Flux L/m^2−h			50-1000	10-200	1-20	-
Rango de retención						
Especie	Peso molecular Da	Tamaño nm				
Hongos		$10^3 - 10^4$	X			
Levaduras		$10^3 - 10^4$	X			
Bacterias		$300 - 10^4$	X			X
Coloides		$300 - 10^3$	X	X		X
Virus		30 - 300		X		X
Proteínas	$10^4 - 10^6$	2-10		X		X
Polisacárido	$10^4 - 10^6$	2-10		X		X
Enzimas	$10^4 - 10^6$	2-5				X
Antibióticos	$300 - 10^3$	0.6 - 1.2			X	
Azúcar	200 - 400	0.8 - 1			X	
Ác. Orgánico	100- 500	0.4 - 0.8			X	
Ión inorgánico	10 - 100	0.2 - 0.4			X	

Adaptada de: Fane y Radovich, 1990.

Ultrafiltración

La ultrafiltración utiliza membranas generalmente asimétricas o anisotrópicas para separar macromoléculas y partículas, de moléculas pequeñas y solventes (Fig. 10.2a). El diámetro de los poros de este tipo de membranas varía entre $0.001 - 0.1$ μm.

Tamaño de corte Las membranas utilizadas en UF se caracterizan por su Peso Molecular de Corte (PMC), el cual es el peso molecular del soluto globular que es retenido en un 90 % por la membrana. El PMC varía entre 500 y $1,000,000$ Da para la mayoría de las membranas de UF, lo cual representa la retención de partículas de 1 a $10,000$ nanómetros de tamaño. Las presiones características de la ultrafiltración son moderadas en el rango de 100-500 kPa. Las capacidades características son del orden de $10 - 200$ L/m^2−h (al flujo volumétrico por unidad de área de membrana se le conoce como flux y se utiliza para especificar equipos de UF).

Microfiltración

La microfiltración (MF) emplea membranas con poros más grandes que los utilizados en UF ($0.1 - 10$ μm), ya sean de tipo convencional o asimétricas.

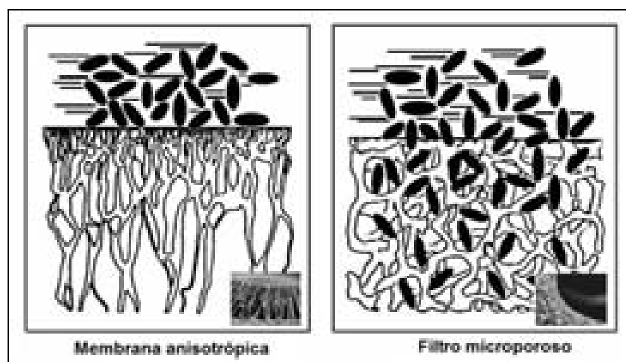


Figura 10.1: Comparación de membranas convencionales con anisotrópicas. Fuente: Santos, *et al*, 1991. Reproducida con el permiso de Kluwer Academic Publishers. Copyright ©1991. Todos los derechos reservados.

La microfiltración (Fig. 10.2b) se emplea generalmente para separar de caldos biológicos partículas mayores de 1.0 μm como coloides y células. Actualmente la MF tiende a desplazar a la filtración convencional y a la centrifugación como técnica de recuperación celular. El rango de presión de operación también es restringido debido a las características de los equipos que se emplean, y es del orden de $160-500$ kPa. Un rasgo característico de la MF es que puede manejar flujos mucho mayores que la UF del orden de $50-1000$ L/m^2−h.

Ósmosis inversa

La ósmosis inversa (Fig. 10.2c) es una operación que utiliza membranas semipermeables que permiten el paso sólo del solvente (generalmente agua), para separar éste de solutos de bajo peso molecular. La fuerza impulsora es un gradiente de presión que debe vencer la presión osmótica normal de las soluciones, es decir, invertir el flujo espontáneo. Las presiones utilizadas en esta operación son relativamente altas del orden de $700-20,000$ kPa. Las membranas utilizadas en OI son películas que permiten el paso del solvente a través de espacios entre los polímeros que conforman la membrana. Los iones no pueden estar solvatados en estos pequeños espacios y por lo tanto no son transportados. Los flujos característicos en la OI son del orden de $1-20$ L/m^2−h.

Diálisis

La diálisis (Fig. 10.2d) emplea membranas de poro muy pequeño (menor que las membranas de UF). Esta operación se utiliza para separar solutos de sus soluciones, con base a su peso molecular y posiblemente a su conformación y carga. El o los solutos a separar de la solución de alimentación fluyen hacia la solución de lavado o dializado a través de la membrana, sólo por la acción de un gradiente de concentración. El papel fundamental de la membrana es impedir el

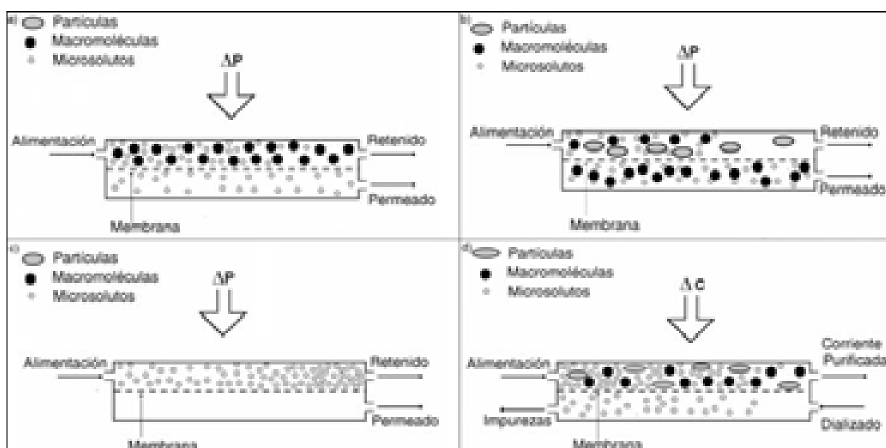


Figura 10.2: Esquemas de las operaciones con membranas. a) Ultrafiltración, b) Microfiltración, c) Ósmosis inversa y d) Diálisis.

paso de macromoléculas o partículas de la alimentación al dializado permitiendo el paso del solvente y de solutos más pequeños.

En los procesos de electrodiálisis la operación de diálisis se efectúa bajo la acción de un campo eléctrico.

10.2.2. Flujo Cruzado o Tangencial

En los procesos de separación por membrana se producen gradientes de concentración de los solutos en la proximidad de la membrana, causados por las diferentes velocidades de transporte de cada uno de ellos. Este efecto es conocido como "Polarización de la concentración".

Esta polarización actúa de dos formas:

a) En los procesos de diálisis disminuye el gradiente de concentración efectivo, disminuyendo por lo tanto el flux de impurezas.

b) En los procesos de MF, UF y OI, produce un incremento de la concentración de solutos en la proximidad de la membrana (Fig. 10.3), lo cual por un lado puede incrementar el flux de soluto, y por otro disminuir el flux del solvente debido a un aumento de la resistencia al flujo producida por esta barrera de concentración. Asimismo, puede ocasionar una resistencia adicional debido a que puede estimular la interacción del soluto con la membrana ocasionando que ésta se incruste con soluto.

El flux de solvente a través de la membrana puede ser incrementado significativamente utilizando flujo cruzado o tangencial en lugar del flujo de extremo-cerrado convencional (Fig. 10.4). En los sistemas de flujo cruzado la alimentación fluye en forma paralela a la membrana minimizando el efecto de la polarización

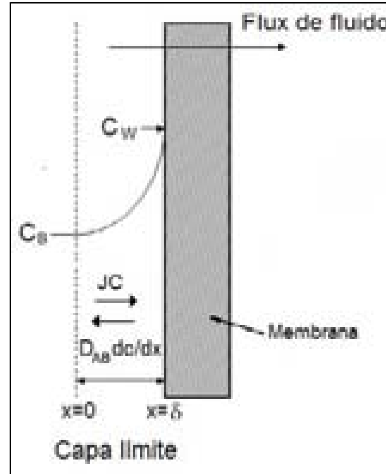


Figura 10.3: Gradiente de concentración durante la UF. Fenómeno de polarización. Fuente: Tutunjian, 1985b.

de la concentración, ya que el esfuerzo cortante del fluido estimula el desplazamiento de las partículas de la superficie de la membrana.

10.2.3. Teoría de la Ultrafiltración

La teoría de la ultrafiltración está orientada a tratar de predecir el flux en un sistema dado en función de los parámetros de operación como son: presión, temperatura, concentración de la solución y velocidad tangencial. Es importante señalar que la teoría de la ultrafiltración es de aplicación limitada, pero es útil en la interpretación y extrapolación de los datos experimentales, así como de guía para la operación de los equipos (Kovácsa *et al.*, 2009).

El principal parámetro de diseño de un sistema de UF para concentrar una solución es el área necesaria para lograr una concentración determinada en un tiempo dado, bajo limitaciones de rangos de presión y temperatura tolerados por los equipos. La predicción del flux o la interpretación y extrapolación correcta de las mediciones experimentales de éste, se enfocan a resolver este problema de diseño.

Flux

En UF se utiliza la variable J para describir el flux de permeado o velocidad del permeado a través del lecho filtrante, mientras que en la filtración convencional se utiliza la variable ν para el mismo efecto, es decir,

$$J = \nu = \frac{Q}{A} = \frac{\text{Gasto volumétrico}}{\text{Área}}$$

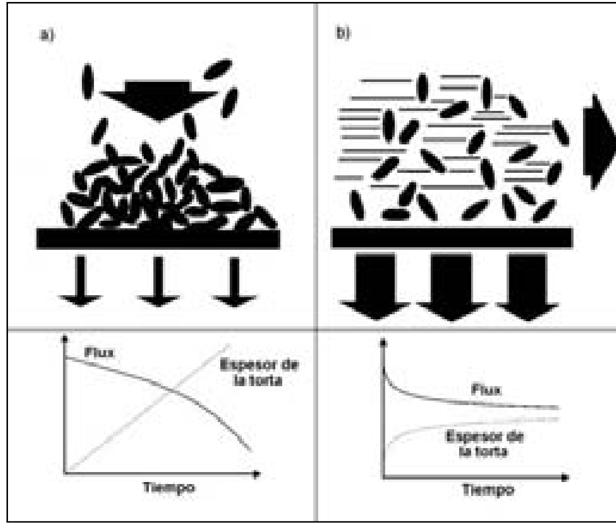


Figura 10.4: Formas de de alimentación en UF. a) Convencional y b) Flujo cruzado.

Gradiente de presión transmembrana

La fuerza impulsora de un proceso de UF es el gradiente de presión transmembrana (ΔPTM), el cual puede ser definido en referencia a la Figura 10.5a como:

$$\Delta PTM = \frac{(P_i + P_o)}{2} - P_f \tag{10.1}$$

o bien,

$$\Delta PTM = \frac{\Delta P}{2} + P_o - P_f$$

donde:

ΔPTM: Gradiente de presión transmembrana.

P_i: Presión de entrada de la alimentación.

P_o: Presión de salida del retenido.

P_f: Presión de salida del permeado o filtrado.

$\Delta P = P_i - P_o$: Gradiente de presión del flujo tangencial.

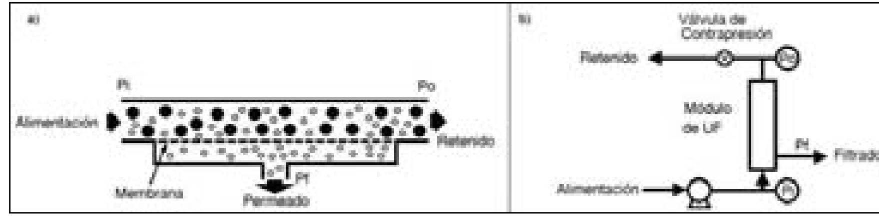


Figura 10.5: Relación de presiones en UF. a) Flujo y b) Válvulas. Fuente: Tutunjian, 1985b.

En este arreglo la bomba debe ser dimensionada para proveer la velocidad de flujo cruzado necesaria así como la ΔPTM. Esta última es controlada restringiendo la válvula de contrapresión a la salida de la unidad de UF. La Figura 10.5b muestra el hecho de que las presiones de entrada y salida a la unidad, pueden ser monitoreadas con el empleo de manómetros.

Ejemplo 10.1. Cálculo de ΔPTM

La presión de alimentación a una unidad de UF es de 1.70 kg/cm^2. La válvula de salida de la unidad se ajusta de tal manera que la caída de presión del flujo tangencial es de 0.68 kg/cm^2 y la presión del permeado despreciable.

Se pide: Estimar ΔPTM.

Solución:

Se puede utilizar la ecuación (10.1) para calcular ΔPTM. Primero es necesario calcular P_o. Conociendo que

$$\Delta P = P_i - P_o$$

entonces

$$P_o = (1.70 - 0.68)\ \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2} = 1.02\ \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

y

$$\Delta PTM = \frac{(1.7 + 1.02)}{2}\ \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2} = 1.36\ \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

Efecto de la concentración y del flujo cruzado sobre la UF

La Figura 10.6a muestra el comportamiento típico de un proceso de ultrafiltración de una macromolécula en celdas de ultrafiltración agitadas (sin flujo cruzado). Este comportamiento se describe en función de la variación de flux del permeado J (cm^3/cm^2−min) con el gradiente de presión transmembrana (ΔPTM) para soluciones de concentración en el rango de 0 a 65 %.

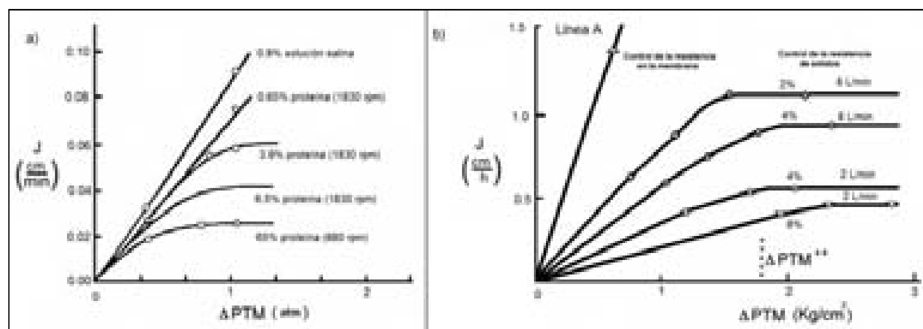


Figura 10.6: a) UF de albúmina en una celda. Fuente: Belfort, 1987. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons. Copyright ©1987. Todos los derechos reservados. b) Efecto de la presión, velocidad de recirculación y concentración sobre el flux. Fuente Le y Howell, 1985. Reproducida con el permiso de Elsevier Science Inc. Copyright ©1985.

Se obtienen resultados análogos a los anteriores cuando se utilizan equipos operando con flujo cruzado constante (Fig. 10.6b). Sin embargo, al aumentar la velocidad de flujo cruzado U se produce un incremento en el flux J ($cm^3/cm^2 - h$).

Modelo general del flux

La predicción del flux a que hace referencia el título de esta sección consiste en encontrar relaciones que permitan describir y predecir el comportamiento experimental descrito anteriormente. La descripción fenomenológica del flux en un proceso de ultrafiltración, se ha efectuado por varios caminos con resultados análogos, algunos de los cuales se describen a continuación.

Modelo termodinámico Por medio de la termodinámica de los procesos irreversibles, la ecuación del flux de solvente que se obtiene en un sistema de UF es:

$$J = L_p(\Delta PTM - \sigma \Delta \pi) \tag{10.2}$$

donde:

L_p: Coeficiente de permeabilidad.

σ: Coeficiente de retención del soluto por la membrana.

$\Delta\pi$: Contrapresión osmótica.

J: Flux de permeado.

Modelo basado en la ley de D'arcy Por otro lado, cuando se utiliza la ley de D'arcy como se hizo en el caso de la filtración convencional (Capítulo 3) se obtiene la siguiente expresión:

$$J = \frac{\Delta PTM - \sigma \Delta \pi}{\mu(R_m + R_s)} \tag{10.3}$$

donde:

R_m: Resistencia de la membrana.

R_s: Resistencia de la capa de soluto de polarización.

El coeficiente de retención en un instante dado durante el proceso de UF está definido de la manera siguiente:

$$\sigma = 1 - \frac{C_P}{C_B} \tag{10.4}$$

donde:

C_P: Concentración de soluto en el permeado.

C_B: Concentración de soluto en el seno de la solución.

σ: Coeficiente de retención del soluto por la membrana.

$\sigma = 1$: Retención completa del soluto por la membrana.

$\sigma = 0$: Retención nula del soluto por la membrana.

Modelo de resistencias De acuerdo a las ecuaciones (10.2) y (10.3), el coeficiente de permeabilidad se puede expresar como:

$$L_p = \frac{1}{\mu(R_m + R_s)} \tag{10.5}$$

Dado que la presión osmótica para macromoléculas en solución y para dispersiones coloidales es muy baja, en dicho caso el modelo general de flux en la forma de la ecuación (10.3) se transforma en:

$$J = \frac{\Delta PTM}{\mu(R_m + R_s)} \tag{10.6}$$

Análisis del comportamiento experimental de la UF

Para analizar los resultados experimentales de la UF de una solución de una concentración dada (Fig. 10.6b), es conveniente dividirlos en dos regiones separadas por un gradiente de referencia ΔPTM^{++}:

a) Región I. Localizada a la izquierda de ΔPTM^{++}, donde J es función de ΔPTM y de la velocidad de recirculación U.

b) Región II. Localizada a la derecha de ΔPTM^{++}, donde J sólo es función de U (independiente de ΔPTM).

Además, se puede utilizar la ecuación (10.6) para realizar el análisis correspondiente:

1. En soluciones diluidas la resistencia R_s puede considerarse nula. Si además se considera R_m constante, entonces J varía linealmente con ΔPTM (línea A).

2. En la Región I donde $\Delta PTM < \Delta PTM^{++}$, se puede considerar que $R_m > R_s$, es decir la resistencia de la membrana es controlante. Es una zona donde J depende de ΔPTM; los incrementos en ΔPTM producen un aumento en R_s, de tal manera que J tiende a un valor máximo conforme aumenta ΔPTM.

3. En la Región II donde $\Delta PTM > \Delta PTM^{++}$, se puede considerar que $R_s > R_m$. Los sólidos retenidos representan la resistencia controlante, de tal manera que J es independiente de ΔPTM. Los incrementos en ΔPTM producen incrementos en R_s tales, que no se produce un incremento en J. Esta región es más sensible a la velocidad del flujo cruzado por actuar ésta directamente sobre R_s.

El uso del modelo general para la predicción del flux requiere poder expresar R_s en términos de parámetros medibles como se hizo en el caso de la resistencia de la torta R_t, en el capítulo de filtración convencional. Los intentos que se han efectuado en este sentido son de uso limitado para el caso de UF de proteínas y coloides.

Modelo de polarización con película estancada (Región I)

Otro enfoque para obtener el modelo del flux propone que el fenómeno de polarización de la concentración sólo se presenta en una película delgada del fluido en la proximidad de la membrana (Teoría de la capa límite). En esta película el perfil de concentración es función de ΔPTM. Considerando como única variable la ΔPTM, los perfiles de concentración en estado estacionario se irán incrementando conforme se incremente ΔPTM (Fig. 10.7).

Un balance de soluto en estado estacionario en una película diferencial en la interfase fluido-membrana puede ser expresado como:

Movimiento convectivo de soluto hacia la interfase	=	Movimiento difusivo del soluto de la interfase al seno del fluido	+	Movimiento convectivo de soluto fuera de la interfase

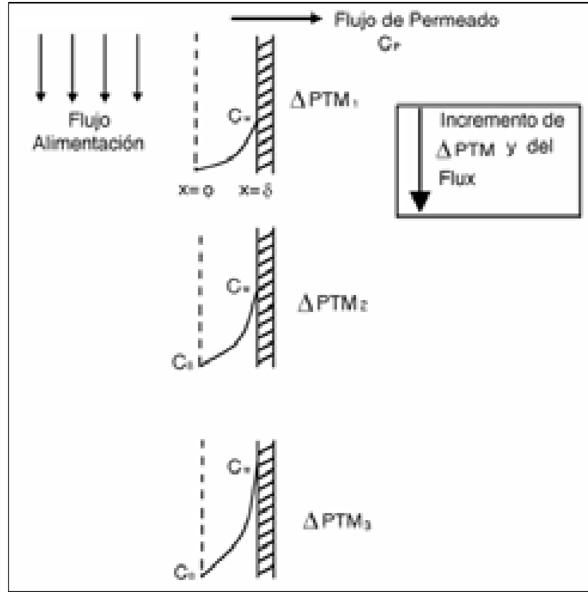


Figura 10.7: Variación del perfil de concentración en estado estacionario con el gradiente de presión transmembrana. C_B : concentración de soluto en la alimentación. C_W: concentración de soluto en la pared de la membrana. C_P: concentración de soluto en el permeado. δ: espesor de la capa límite de concentración.

$$J^*C = D_{AB}\frac{dC}{dx} + J^*C_P^* \tag{10.7}$$

donde:

* : Constantes en estado estacionario.

ΔPTM: Constante.

D_{AB}: Difusividad del soluto en la solución.

x: Coordenada espacial.

Separando variables e integrando a lo largo de la capa límite con:

$$x = 0; \quad C = C_B$$
$$x = \delta; \quad C = C_W$$

La ecuación (10.7) se transforma en:

$$J^* = \frac{D_{AB}}{\delta} \ln\left(\frac{C_W^* - C_P^*}{C_B - C_P^*}\right) \tag{10.8}$$

Si la membrana presenta un coeficiente de retención total $C_P = 0$, entonces la ecuación (10.8) se simplifica a:

$$J^* = \frac{D_{AB}}{\delta} \ln\left(\frac{C_W^*}{C_B}\right) \tag{10.9}$$

dado que el espesor de la película δ generalmente es desconocido, el coeficiente D_{AB}/δ se sustituye por un coeficiente de transferencia de masa k_s, de tal manera que:

$$J^* = k_s \ln\left(\frac{C_W^*}{C_B}\right) \tag{10.10}$$

Coeficientes de transferencia de masa El modelo de película permite analizar la dependencia del flux J^* con los parámetros físicos y geométricos que afectan δ. El coeficiente de transferencia de masa k_s puede ser estimado por medio de correlaciones experimentales de la literatura, donde los parámetros que afectan el espesor de la capa límite de la transferencia de masa, se agrupan en grupos adimensionales como el Reynolds, el Schmidt y el Sherwood.

Flujo en tubos circulares rectos Para flujo laminar en tubos circulares rectos para calcular el coeficiente de transferencia de masa se pueden utilizar las correlaciones siguientes:

$$\frac{k_s d_t}{D_{AB}} = 1.295 \left(\frac{d_t}{2L}\right)^{1/3} \left(\frac{d_t U \mu}{\rho}\right)^{1/3} \left(\frac{\mu}{\rho D_{AB}}\right)^{1/3}$$

o bien en términos de números adimensionales,

$$Sh = 1.295 \left(\frac{d_t}{2L} Re Sc\right)^{1/3} \tag{10.11}$$

En el caso de flujo turbulento:

$$Sh = 0.023 Re^{0.83} Sc^{0.33} \tag{10.12}$$

donde:

d_t: Diámetro del tubo. $[L]$.

D_{AB}: Difusividad del soluto. $[L/t^2]$.

L: Longitud del tubo. $[L]$.

U: Velocidad promedio del fluido en el tubo. $[L/t]$.

μ: Viscosidad. $[M/L-t]$.

ρ: Densidad. $[M/L^3]$.

Re: Número de Reynolds.

Sc: Número de Schmidt.

Sh: Número de Sherwood.

Es importante hacer notar que de acuerdo a las ecuaciones (10.11) y (10.12):
1. Para flujo laminar:

$$J^* \propto \left(\frac{U}{L}\right)^{1/3} \tag{10.13}$$

o bien cuando se usa el esfuerzo cortante definido como:

$$U = \frac{d_t\dot{\gamma}}{2} \tag{10.14}$$

entonces,

$$J^* \propto \left(\frac{\dot{\gamma}}{L}\right)^{1/3} \tag{10.15}$$

donde $\dot{\gamma}$ es el esfuerzo cortante del fluido sobre la membrana.
2. Para flujo turbulento:

$$J^* \propto U^{0.83} \tag{10.16}$$

Análisis del comportamiento experimental mediante el modelo de polarización con película estancada (Región I). El modelo de polarización de película conjuntamente con las ecuaciones (10.11) y (10.12) permiten interpretar los resultados experimentales de los procesos de UF en la Región I:
1. El flux J^* considerando U constante, es proporcional a ln $(1/C_B)$.
2. El flux J^* aumenta al aumentar U.
3. El flux J^* varía con $U^{\frac{1}{3}}$ en flujo laminar y con $U^{0.83}$ en flujo turbulento.
4. El flux J^* aumenta al aumentar C_W^* la cual a su vez aumenta con ΔPTM.
Estos resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 10.8.

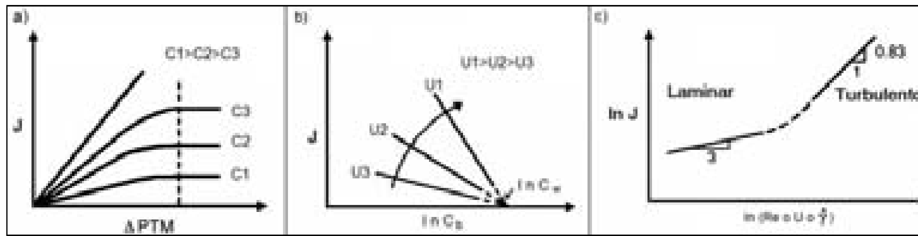


Figura 10.8: Efecto de parámetros de operación sobre el flux. a) Concentración, b) Velocidad de recirculación y c) Reynolds. Fuente: Belfort, 1987. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons. Copyright ©1987. Todos los derechos reservados.

Modelo de polarización en película y capa de gel (Región II)

De acuerdo con el modelo de polarización en película (ecuación 10.10) el flux J puede ser incrementado aumentando la concentración de soluto en la membrana C_W (aumentando ΔPTM). Sin embargo, se observa que en la Región II (Fig. 10.6b), existe un límite para este tipo de correlación.

Uno de los modelos más empleados para la Región II propone que en las soluciones macromoleculares, el aumento de C_W con ΔPTM tiene un límite C_G, donde la solución forma una "capa de gel" (Fig. 10.9). Este gel actúa en serie con las otras resistencias. Este modelo llamado "Modelo de capa de gel", implica que en la Región II de la UF los incrementos en ΔPTM se contrarrestan con incrementos en la resistencia de la capa de gel, de tal manera que J se mantiene constante. De acuerdo a lo anterior, la ecuación (10.10) se transforma en:

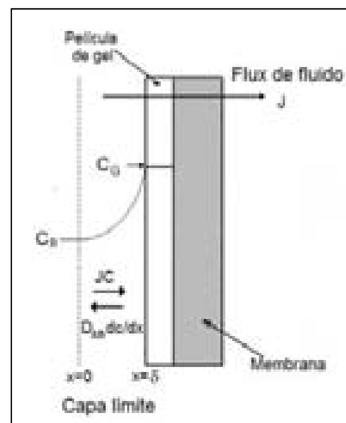


Figura 10.9: Gradiente de concentración durante la polarización con gel. Fuente: Tutunjian, 1985a. Reproducida con el permiso de Nature Publishing Co. Copyright ©1985. Todos los derechos reservados.

$$J = k_s \ln\left(\frac{C_G}{C_B}\right) \tag{10.17}$$

donde C_G es la concentración límite que es una constante para un sistema dado. k_s es el coeficiente de transferencia de masa dado por las correlaciones ya presentadas [ecuaciones (10.11) y (10.12)].

Análisis del comportamiento experimental mediante el modelo de polarización con película y capa de gel (Región II). El modelo de polarización de película y capa de gel, conjuntamente con las ecuaciones (10.11) y (10.12), permiten interpretar los resultados experimentales de los procesos de UF en la Región II:

1. J^* es proporcional a ln $(1/C_B)$ cuando la velocidad de recirculación constante.

2. J^* aumenta al aumentar U. Varía con $U^{\frac{1}{3}}$ en flujo laminar y con $U^{0.83}$ en flujo turbulento.

Ejemplo 10.2. Cálculo de C_G y k_s.

Los datos de flux en L/m^2−h de la UF de una solución proteica se muestran en la Tabla 10.2.

Tabla 10.2: Datos de UF para Ejemplo 10.2.

ΔPTM (kg/cm^2)	Concentración % peso			
	1	5	10	20
0.00	00.00	00.00	00.00	0.00
0.33	18.00	17.50	17.00	7.00
0.66	33.00	30.00	21.80	7.33
1.00	47.00	36.00	22.20	7.66
1.33	50.00	36.50	22.60	8.00
1.66	52.00	37.00	23.00	8.33
2.00	54.00	37.50	23.40	8.66

Se pide: Estimar k_s y C_G para esta operación.

Solución:

En la Figura 10.10 se presentan los datos graficados en la forma de la ecuación 10.17 (gráfica semilogarítmica). Se puede observar que conforme se incrementa la concentración C_B y la ΔPTM, se llega a una región donde la variación del flux se comporta de acuerdo al modelo de película de gel, en la cual el flux J varía sólo con C_B y es independiente de ΔPTM.

a) Cálculo de C_G. Este parámetro puede ser obtenido gráficamente de la intersección de las curvas de la Figura 10.10 con el eje de las abscisas de tal manera que,

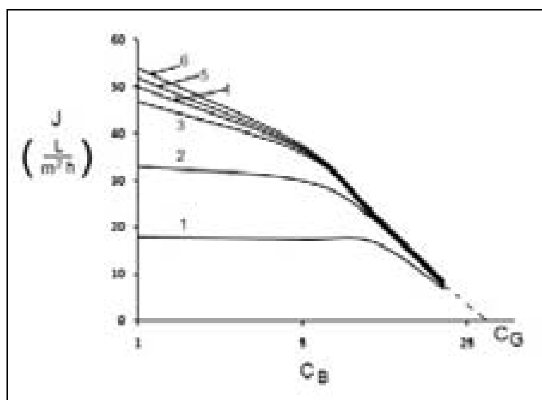


Figura 10.10: Flux vs $\ln C_B$. Datos Ejemplo 10.2. Presión transmembrana. (1) 0.33, (2) 0.66, (3) 1.00, (4) 1.33, (5) 1.66 y (7) 2.00 kg/cm^2.

$$C_G = 30\,\%$$

b) Cálculo de k_s. El coeficiente está dado por la pendiente de las curvas en la zona de formación del gel y puede ser estimada con dos puntos sobre la recta.

$$k_s = \left(\frac{28-8}{3-2}\right)\ \frac{\mathrm{L}}{\mathrm{m}^2-\mathrm{h}} = 20\ \frac{\mathrm{L}}{\mathrm{m}^2-\mathrm{h}}$$

La expresión del flux en la Región II es por lo tanto:

$$J = 20 \ln\left(\frac{30}{C_B}\right)$$

Se puede resumir con base a la discusión de los dos modelos anteriores, que en la ultrafiltración el flux J se puede controlar por medio de la ΔPTM y la velocidad de flujo cruzado. El flux aumenta linealmente con ΔPTM en su fase inicial, posteriormente empieza a disminuir la rapidez de aumento, y finalmente cuando ocurre la polarización J se hace independiente de ΔPTM y permanece constante.

El flux puede mejorarse incrementado la velocidad del flujo cruzado, lo cual implica un incremento en el esfuerzo cortante sobre la superficie de la membrana.

Incrustación de la membrana

Uno de los problemas que se observa durante la operación de un sistema de UF es la reducción progresiva en el flux manejable conforme aumenta el

tiempo de uso de las membranas. Este fenómeno llamado "Incrustación de la Membrana" debe distinguirse del fenómeno de polarización de la membrana.

El fenómeno de incrustación se refiere a la interacción de algunos solutos con la membrana que afectan la porosidad de la misma. Los sistemas de membrana utilizan generalmente procesos de sanitación y limpieza con soluciones de NaOH. La efectividad de estos procesos se mide mediante la permeabilidad con agua normalizada (NWP de sus siglas en inglés). Típicamente, cuando este valor disminuye a un 60 % de su valor inicial las membranas son removidas.

Ejemplo 10.3. Concentración por MF por lotes con flujo cruzado: remoción de torta e incrustación.

En un sistema de MF por lotes con flujo cruzado, conforme se obtiene el permeado, disminuye el volumen y aumenta la concentración de solución en el tanque.

El balance de soluto cuando se utiliza flujo cruzado en el sistema con $C_P = 0$ se puede escribir como:

$$\frac{d}{dt}(VC_B) = -A\frac{dm}{dt}$$

donde m es la masa de soluto retenida por la membrana.

Este balance está sujeto a las siguientes condiciones:

$$\text{Para} \qquad J \leq J^{\circ} \qquad \frac{dm}{dt} = C_B J - km$$

$$\text{Para} \qquad J > J^{\circ} \qquad \frac{dm}{dt} = C_B J$$

donde k es una constante que depende del tamaño y distribución de las partículas y el potencial de su adhesión a la membrana. El término km es la velocidad de desprendimiento de la torta. El parámetro J° es un flux crítico. La remoción del gel por flujo cruzado sólo es efectiva si el flux J es menor que J°.

También se cumple que:

$$\frac{dV}{dt} = -JA$$

Combinando las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$\text{Para} \qquad J \leq J^{\circ} \qquad \frac{dC_B}{dt} = \frac{Akm}{V}$$

$$\text{Para} \qquad J > J^{\circ} \qquad \frac{dC_B}{dt} = 0$$

El flux se puede expresar como:

$$J = \frac{\Delta PTM}{\mu(R_m + R_s)} = \frac{\Delta PTM}{\mu(R_m + \alpha m)} = \frac{\Delta PTM}{\mu(bR_{m0} + \alpha m)}$$

donde R_{m0} es la resistencia de la membrana limpia y b es un coeficiente de incrustación de la membrana.

En un estudio experimental de MF por lotes con flujo cruzado de levaduras y bentonita se obtuvieron los siguientes datos (Mhurchúa y Foley, 2006):

$k = 4.25 \times 10^{-3}$ s^{-1}	$\Delta PTM = 10^5$ kg/m$-$s^2
$R_{m0} = 7.43 \times 10^{11}$ m^{-1}	$c_0 = 0.5$ kg/m^3
$b = 5.12$	$A = 7.53 \times 10^{-3}$ m^2
$\alpha^* = 10.9 \times 10^{14}$ m/kg	$V_0 = 2 \times 10^{-3}$ m^3
$\mu = 1 \times 10^{-3}$ kg/m$-$s	$J^\circ = 6 \times 10^{-6}$ m/s
$\nu = 2.3$ m/s	
* valor sobreestimado	

Se pide:

Obtener la variación del flux de permeado y del volumen de permeado con el tiempo de filtración.

Solución:

En la Figura 10.11 se presenta un programa MATLAB para la solución del ejemplo y en la Figura 10.12 los resultados gráficos.

Figura 10.11: Programa MATLAB para la solución del Ejemplo 10.3. a) programa principal y b) función.

10.3. Equipos de Ultrafiltración

Los equipos utilizados en los procesos con membranas generalmente operan con flujo cruzado o tangencial y presentan dos características distintivas:

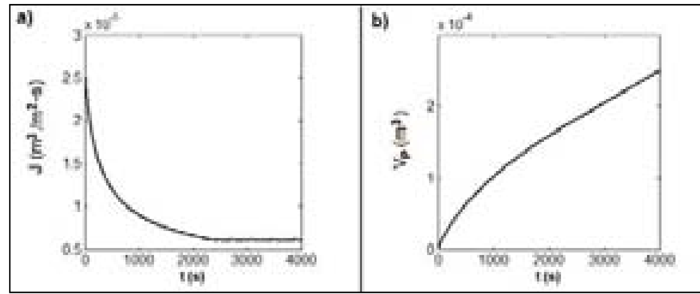


Figura 10.12: Resultados del Ejemplo 10.3. a) Variación del flux con el tiempo y b) Acumulación de volumen de permeado.

a) utilizan una membrana apropiada para el tipo de proceso y b) presentan diferentes geometrías en arreglos tipo modular (van Reis y Zydney, 2007).

El equipo modular conjuntamente con el equipo periférico constituye la unidad de filtración. Parte importante del equipo periférico es la bomba de alimentación y el tanque de almacenamiento. Un arreglo típico de un sistema de UF se muestra en la Figura 10.13.

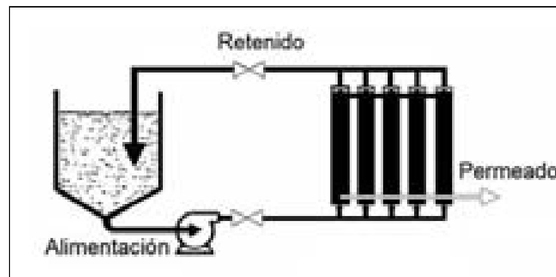


Figura 10.13: Sistema típico de UF por lotes. Fuente: Belter *et al.*, 1988.

10.3.1. Membranas

La parte central de los procesos con membranas es la membrana misma. En general la membrana debe reunir algunas características importantes: a) una alta permeabilidad hidráulica, es decir, permitir altos flujos de permeado bajo gradientes de presión razonables, b) un peso molecular de corte preciso, es decir, retener especies de determinado peso molecular, pero permitir el paso de las de menor peso molecular, c) buena resistencia mecánica, química y térmica, d) baja tendencia a incrustamiento, e) facilidad de limpieza, f) capacidad de esterilización y g) larga vida activa.

Los materiales que se utilizan en la fabricación de membranas generalmente son derivados de polímeros naturales como la celulosa o de polímeros sintéticos. Recientemente se han desarrollado varios tipos de membranas de materiales cerámicos y metálicos.

En la Tabla 10.3 se presenta una lista de algunos materiales y características de las membranas.

Tabla 10.3: Características típicas de las membranas.

	MF	UF	OI	D	pH	$T_{máx}$
Materiales:						
Acetato de celulosa	X	X	X	X	3-10	75
Poliamida	X	X	X		2-12	-
Polisulfona	X	X	X		1-14	130
Politetrafluro Etileno	X				1-14	140
Polipropileno	X				1-14	130
Cerámica	X				1-13	140
Poliéster	X	X			-	150
Estructura:	Asimétrica Simétrica	Asimétrica	Asimétrica	Simétrica		
% de Porosidad Superficial:	30-70	1-10	-	10-20		
Tamaño de poro:	$0.1 - 1\ \mu m$	$1 - 20\ nm$	-	$0.3 - 3\ nm$		

Adaptada de: Brocklebank, 1990.

10.3.2. Módulos

La filtración en membranas en flujo cruzado se puede desarrollar en varios tipos de configuraciones mediante módulos que contienen las membranas. Estos módulos están diseñados para satisfacer las especificaciones: a) mecánicas necesarias para asegurar la separación de las corrientes, soportar las membranas, permitir el retrolavado y una presión de operación razonable, b) hidrodinámicas para minimizar la caída de presión, la polarización, el taponamiento y la incrustación en la membrana y c) económicas para proveer una alta densidad de empaque (área/volumen) y reducir los costos de operación.

Los módulos utilizados en los equipos de separación con membrana presentan diferentes geometrías que se pueden dividir en tres tipos básicos:

1) Módulos de hojas: a) hoja plana, b) hoja plegada y c) hoja enrollada en espiral.

2) Módulos de tubos y carcaza: a) tubos normales y b) fibras huecas.

3) Módulos dinámicos: a) cilindros giratorios, b) discos giratorios y c) sistemas vibratorios.

Módulos de hoja plana

Los módulos de hoja plana (Fig. 10.14a) son muy similares a los filtros convencionales de marcos y placas. Su principal ventaja es su versatilidad. Este tipo de módulos pueden trabajar a presiones mayores que los otros tipos, por lo que son empleados para manejar soluciones viscosas. Los módulos de hoja plana pueden ser utilizados tanto en MF como en UF. Además, pueden ser desmontados para su limpieza y permiten restituir hojas defectuosas. Una desventaja es que su área por unidad de volumen es menor en relación a los otros tipos de módulos y producen un flux moderado.

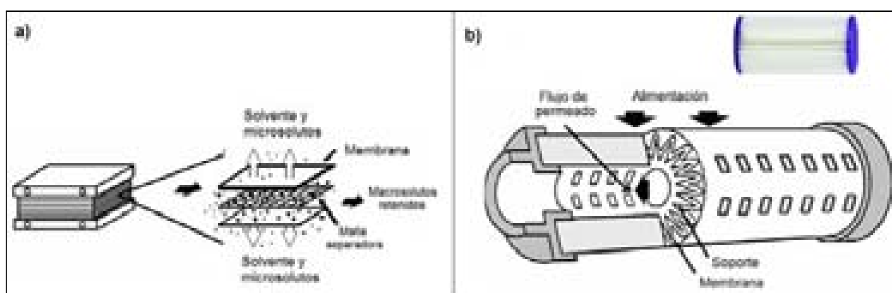


Figura 10.14: a) Módulo de UF de hoja plana. Fuente: Tutunjian, 1985b. Reproducida con el permiso de Elsevier Science Inc. Copyright ©1985. Todos los derechos reservados. b) Módulo de UF de hoja plegada. Fuente: Dziezak, 1990. Reproducida con el permiso del Institute of Food Technologiests. Copyright ©1990. Todos los derechos reservados.

Módulos de hoja plegada

Los módulos con membranas en forma de hoja plegada (Fig. 10.14b) permiten un arreglo tubular con área ampliada, por lo que presentan propiedades similares a los de hoja enrollada en espiral.

Módulos de hoja enrollada en espiral

Los módulos de hojas enrolladas en espiral (Fig. 10.15) utilizan un diseño de membranas con espaciadores tipo malla separando la membrana. Este tipo de arreglos producen un flux mayor que los de hoja plana debido a que presentan una mayor área por unidad de volumen. Son más difíciles de limpiar y frecuentemente debe descartarse toda la unidad aun cuando sólo parte del módulo esté dañado. Como consecuencia este tipo de módulo se recomienda para caldos relativamente limpios o en combinación con un prefiltro.

Módulos de tubos y carcaza

Los módulos de tubos y carcaza presentan una geometría similar a los intercambiadores de calor de tubos, con varios tubos unidos en sus extremos a

Figura 10.15: Módulo de UF de hoja enrollada en espiral. a) Cartucho y b) Esquema de flujo. Fuente: Hanisch, 1986. Reproducida con el permiso de Marcel Dekker Inc. Copyright ©1986. Todos los derechos reservados.

un cabezal común (Fig. 10.16a). Normalmente la alimentación fluye a presión a través del cabezal de entrada por el interior de los tubos, de tal manera que el permeado se colecta en la parte externa de los tubos a través de la carcaza y el retenido sale por el extremo opuesto de los tubos a través del cabezal de salida. El diámetro de los tubos varía entre 0.6 y 2.5 cm. Los tubos son fabricados utilizando polímeros o cerámica, lo que les confiere una alta resistencia mecánica y térmica. Han sido recomendados para procesar materiales viscosos y para la obtención de concentraciones celulares elevadas.

Módulos de tubos de fibra hueca

Los módulos de tubos de fibra hueca (Fig. 10.16b) son muy parecidos a los de tubos y carcaza convencionales, sin embargo los diámetros de los tubos son muy pequeños: de 0.02 a 0.11 cm. Entre más pequeño sea el diámetro interno, menor es su capacidad de manejo de sólidos. Las fibras grandes (0.11 cm de diámetro) son especialmente útiles para separar células y para el manejo de materiales viscosos. Este tipo de módulos es probablemente el más empleado tanto en MF como en UF, sin embargo presentan algunas limitaciones en cuanto a su rango de operación (presión y temperatura), así como en su facilidad de esterilización. En la Figura 10.16c se presenta un esquema de flujo típico de los módulos de tubos y de fibras huecas.

Módulos dinámicos

Los módulos dinámicos o de esfuerzo de corte aumentado, utilizan para incrementar el esfuerzo de corte una parte móvil como una membrana cilíndrica giratoria, un disco girando en las proximidades de una membrana circular fija o la vibración de la membrana (Fig. 10.17). Este modo de filtración permite

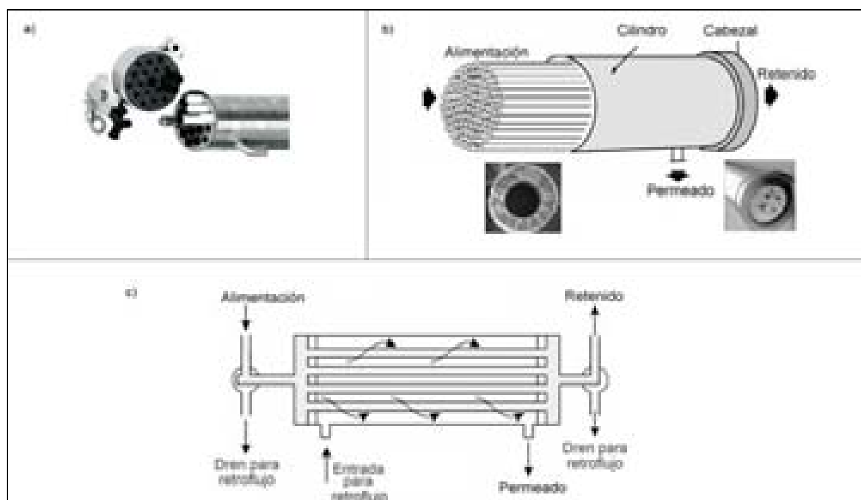


Figura 10.16: Módulos de membranas. a) Módulo de tubo y carcaza, b) Módulo de UF de fibra hueca, cortes y fibra individual y c) Esquema de flujo. Fuente: Dziezak, 1990.

incrementar los fluxes y la selectividad de las membranas. También permite desacoplar la velocidad de alimentación del esfuerzo cortante (Jaffrin, 2008).

En la UF clásica se utiliza un flujo tangencial y diámetros o espesores pequeños de flujo para incrementar el esfuerzo de corte y disminuir la polarización en la membrana. Esta operación requiere más potencia de bombeo y provoca una distribución no uniforme de la presión transmembrana, que afecta el comportamiento óptimo del sistema.

Membranas cilíndricas giratorias Los primeros sistemas de filtración dinámicos comerciales se basan en el uso de una membrana cilíndrica girando dentro de un cilindro concéntrico fijo (Fig. 10.17a). Estos sistemas incrementan el esfuerzo de corte sobre la membrana mediante los vórtices de Taylor que se forman cuando la membrana sobrepasa la velocidad angular crítica (Bird *et al.*, 2002). La máxima área de estos sistemas comerciales es de 2.0 m^2.

Sistemas de discos giratorios Los sistemas de discos giratorios (Fig. 10.17b) proveen una mayor área de filtración y consisten en un conjunto de discos montados sobre una o varias flechas que giran entre membranas circulares de hasta 85 cm de diámetro y áreas hasta de 100 m^2. Estos sistemas toleran hasta 600 kPa de presión y están disponibles con membranas poliméricas o de cerámica (Serra y Wiesner, 2000).

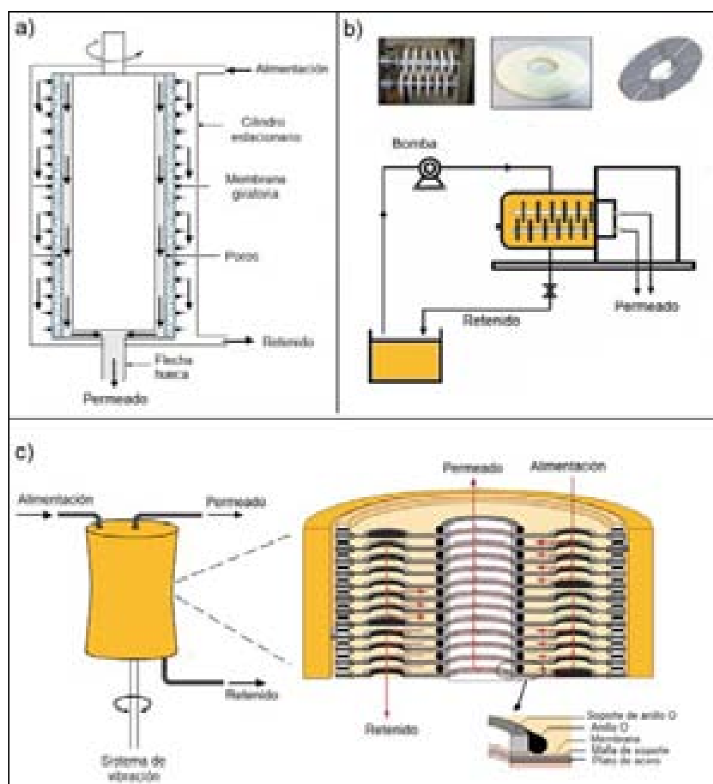


Figura 10.17: Módulos dinámicos. a) Membrana cilíndrica giratoria, b) Discos giratorios y c) Sistemas vibratorios.

Sistemas vibratorios Los sistemas de procesamiento de esfuerzo de corte aumentado por medio de vibración (VSEP) consisten en una pila de membranas circulares separadas por placas y mallas colectoras, que se montan sobre flechas de torsión verticales (Fig. 10.17c) que se hacen oscilar a velocidades de 60 Hz. El esfuerzo de corte sobre la membrana se produce por la inercia del retenido y alcanza valores de hasta $150,000$ s^{-1} (equivalentes a 200 G), que equivale a 10 veces del esfuerzo de corte de los sistemas convencionales. Estos sistemas se disponen con áreas hasta de 32 m^2 para aplicaciones biotecnológicas.

En la Tabla 10.4 se presenta un resumen de las principales características de algunos de los módulos empleados en las operaciones con membranas.

10.4. Diseño de Equipos de UF

En el diseño de un proceso de UF se deben considerar cuatro aspectos principales:

Tabla 10.4: Características de los módulos de UF.

Característica	Tipo de módulo Hoja plana	Hoja enrollada	Tubo y carcaza	Fibra hueca
Densidad de empaque	Moderada	Moderada	Baja	Alta
Área (m^2/m^3)	200-400	300-900	150-300	9000-30,000
Tolerancia a sólidos suspendidos	Moderada	Baja	Buena	Baja
Facilidad de limpieza	Regular	Regular	Buena	Retrolavado
Reemplazo	Hojas o módulo	Módulo	Tubos	Módulo

Adaptada de: Fane y Radovich, 1990.

- El objetivo de la UF.
- La mecánica de fluidos del sistema.
- El método de operación apropiado.
- El diseño de la unidad de UF.

10.4.1. Objetivo de la UF

Un sistema de UF puede ser empleado con distintos propósitos entre los cuales se pueden mencionar los siguientes: a) concentración de una solución diluida, b) diafiltración de una solución con solutos indeseables pequeños y c) purificación de una solución que contiene solutos indeseables grandes.

Concentración por lotes

En la UF donde el objetivo es la concentración por lotes de una solución, la solución retenida es el producto deseado (Fig. 10.18a). Obviamente que el tamaño de corte de la membrana debe ser seleccionado apropiadamente para lograr este propósito.

Diafiltración

En la diafiltración se separan macromoléculas de una solución, de moléculas pequeñas como sales, azúcares o alcoholes por medio de un equipo de UF. El permeado que sale del sistema es reemplazado con agua desionizada o buffer (Fig. 10.18b).

Purificación

La UF donde el objetivo es recuperar el permeado que contiene un solvente de interés o una solución con solutos de bajo peso molecular se conoce como purificación (Fig. 10.18c).

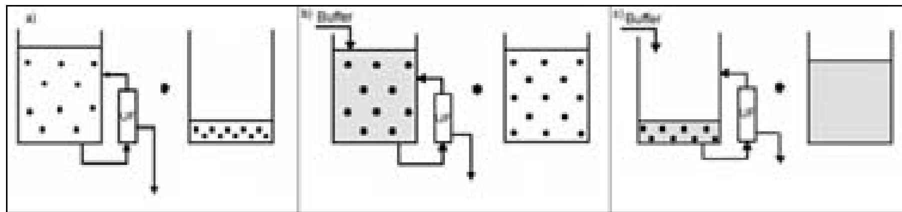


Figura 10.18: Esquemas de las formas de conducir una operación de UF. a) Concentración por lote, b) Diafiltración y c) Purificación. Fuente: Tutunjian, 1985b.

Algunos procesos combinan las operaciones descritas anteriormente, como es el caso de la operación de concentración con diafiltración.

10.4.2. Mecánica de Fluidos

En un sistema de UF el flux es función de la presión transmembrana ΔPTM y de la velocidad del flujo cruzado. Teóricamente el flux puede incrementarse tanto como sean incrementados estos parámetros. Sin embargo, existen limitantes en cuanto a la operación de los equipos. La mayoría de los equipos de UF deben operar abajo de 7.0 kg/cm^2 de presión, mientras que los equipos de fibras huecas sólo toleran presiones de hasta 2.7 kg/cm^2.

De acuerdo a la ecuación (10.1),

$$\Delta PTM = \frac{(P_i + P_o)}{2} - P_f$$

Si se supone que la presión de salida del permeado es $P_f = 0$, entonces la ecuación anterior puede rearreglarse de la siguiente forma:

$$\Delta PTM = P_i - \frac{\Delta P}{2} \tag{10.18}$$

donde: $\Delta P = (P_i - P_o)$

La ecuación (10.18) permite optimizar la relación de ΔPTM con ΔP, cuando la P_i se fija como la presión máxima de operación del equipo. Bajo esta condición, al aumentar ΔPTM, la ΔP disminuye y por lo tanto la velocidad del flujo cruzado del fluido. Por el contrario, al disminuir ΔPTM, la ΔP aumenta y por lo tanto aumenta la velocidad del flujo cruzado U. El flux será óptimo para una cierta combinación de ΔP y ΔPTM ; visto de otra manera, para una combinación de P_i y P_o. Esto ocurre generalmente donde se inicia la formación de la película de gel.

Ejemplo 10.4. Mecánica de fluidos en UF.

Se desea optimizar el flux de un sistema de UF a partir de los datos de la Figura 10.19a. La presión de entrada al sistema es fija e igual a 1.7 kg/cm^2. El flujo cruzado se correlaciona con la caída presión de acuerdo a la siguiente expresión:

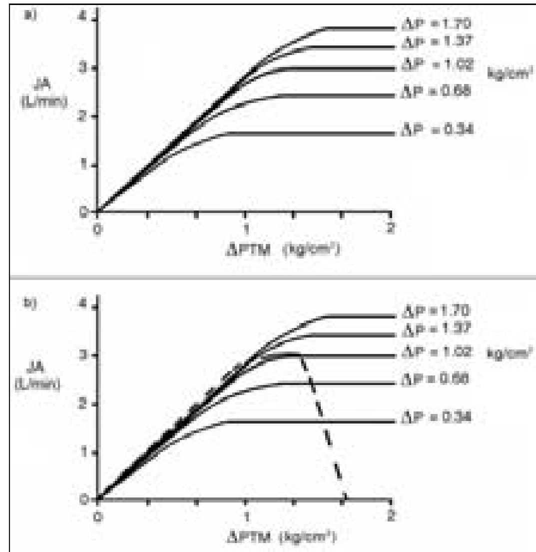


Figura 10.19: Variación del flux con ΔPTM. a) Datos Ejemplo 10.4 con presión de entrada fija y la velocidad de recirculación variable y, b) Región de operación factible. Adaptada de: Tutunjian, 1985b.

$$Q = 29.41\ \Delta P$$

donde ΔP tiene unidades de kg/cm^2 y Q de L/min (área fija).

Se pide:

a) Encontrar la región de operación factible.

b) La combinación ΔPTM y ΔP que permita el máximo flux.

Solución:

a) Región de operación factible. Al fijar la presión de entrada P_i a un valor máximo de 1.7 kg/cm^2, tanto la ΔP como la ΔPTM se restringen a un rango posible de valores, en función de la presión de salida P_o la cual puede ser regulada mediante la válvula de salida.

En la Tabla 10.5 se presentan algunos valores de este rango. La Figura 10.19b muestra la región de operación factible con base a estos datos.

b) Flux máximo. En la Figura 10.19a se puede observar que para cada combinación de P_i con P_o o ΔP con ΔPTM, existe un flux factible alcanzándose un máximo cuando:

$$\Delta P = 1.02 \text{ kg/cm}^2; \quad \Delta PTM = 1.19 \text{ kg/cm}^2; \text{ máximo } \ JA = 2.9 \text{ L/min}$$

Tabla 10.5: Cálculo de la región de operación factible. Datos del Ejemplo 10.4.

kg/cm^2				L/min	
P_i	P_o	ΔP	ΔPTM	Q	JA
1.70	0.00	1.70	0.85	50	2.30
1.70	0.34	1.37	1.02	40	2.80
1.70	0.68	1.02	1.19	30	2.90
1.70	1.02	0.68	1.36	20	2.40
1.70	1.36	0.34	1.53	10	1.70
1.70	1.70	0.00	1.70	00	0.00

En un sistema de UF tanto la región factible de operación como la combinación P_i y P_o que optimiza el flux, son funciones de la concentración de la solución de alimentación.

10.4.3. Métodos de Operación

Los sistemas de UF pueden ser diseñados para operar por lotes (con o sin recirculación interna) o en forma continua.

Operación por lotes

En una operación por lotes sin recirculación (Fig. 10.20a), la solución que inicialmente está contenida en un tanque de proceso, es bombeada a la unidad de UF y regresada al tanque. Conforme transcurre la operación el volumen procesado disminuye hasta alcanzar la concentración final deseada. De esta manera la concentración del producto en el tanque aumenta gradualmente durante el proceso, a la vez que el flux decrece proporcionalmente a ésta.

La operación por lotes con recirculación interna (Fig. 10.20b) emplea dos bombas. Una de recirculación para proveer la velocidad de flujo cruzado óptima y la bomba de alimentación. La velocidad de alimentación debe mantenerse alta, de tal manera que la concentración en el circuito de recirculación sea cercana a la concentración del tanque alimentador. Esto generalmente se logra manteniendo una relación de 20 veces la velocidad de alimentación a la de permeación.

Cuando al tanque de proceso se le alimenta líquido para lavar la solución la operación por lotes respectiva, se convierte en una operación por lotes de diafiltración. La desventaja principal de los sistemas por lotes es que generalmente requieren más tiempo de residencia (lo cual puede afectar al producto) y tanques de proceso más grandes. Este tipo de operaciones también pueden ser útiles en el fraccionamiento de caldos (Lightfoot *et al.*, 2008).

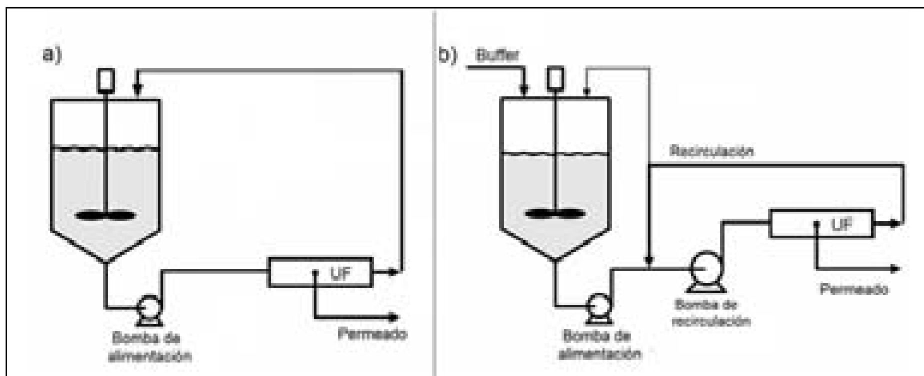


Figura 10.20: Esquemas de UF. a) UF intermitente sin recirculación. Fuente: Tutunjian, 1985b. b) UF intermitente con recirculación. Fuente: Gravatt y Molnar, 1986.

Operación continua

La diferencia entre una operación por lotes y una continua es que en esta última, el retenido es retirado continuamente del sistema a la concentración final deseada (Fig. 10.21a). En estado estacionario el flux es constante y mínimo. Para contrarrestar esta limitación de la operación continua, los sistemas utilizados son generalmente de etapas múltiples (Fig. 10.21b).

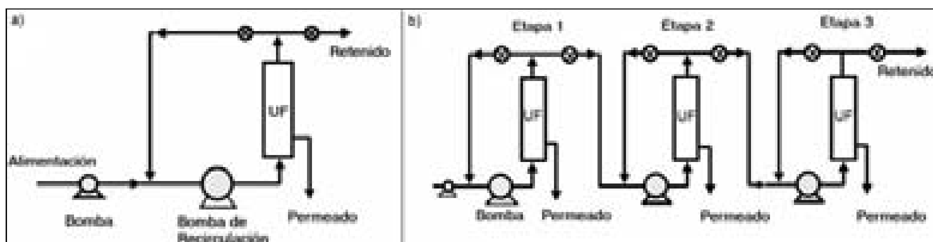


Figura 10.21: UF continua. a) Una etapa y b) Etapas múltiples. Adaptada de: Tutunjian, 1985b.

10.4.4. Diseño de la Unidad de UF

El problema del diseño de la unidad de UF consiste en determinar el área de UF necesaria para procesar una cantidad de una solución de concentración

conocida en un tiempo dado, hasta obtener una concentración final determinada. Generalmente para situaciones de interés práctico, la predicción de coeficientes de transferencia de masa y del flux es limitada, por lo que el diseño requiere de datos experimentales específicos del sistema.

En el caso de los sistemas de diafiltración otro parámetro importante es la cantidad de solvente de lavado que es necesario agregar.

A continuación se presentan las ecuaciones de diseño de algunos arreglos típicos de los sistemas de UF.

Concentración por lotes

En un sistema de concentración por lotes el volumen inicial de solución V_o con una concentración inicial C_{Bo}, se procesa hasta alcanzar un volumen final V_f con una concentración final C_{Bf}, obteniéndose un volumen de permeado V_P.

Un balance de soluto en el sistema, considerando la concentración de soluto en el permeado C_P constante, se puede expresar como:

$$\frac{d}{dt}(VC_B) = C_P \frac{dV}{dt} \tag{10.19}$$

La ecuación anterior integrada entre los límites

$$V = V_o \qquad C_B = C_{Bo}$$

$$V = V \qquad C_B = C_B$$

conduce a:

$$V = V_o \ \exp\left[-\int_{C_{Bo}}^{C_B} \frac{dC_B}{(C_B - C_P)} \right] \tag{10.20}$$

La ecuación (10.19) combinada con la expresión del flux dada por:

$$J = \frac{-1}{A}\frac{dV}{dt} \tag{10.21}$$

donde A es el área de UF, puede ser integrada entre 0 y t, y expresada con ayuda de la ecuación (10.20) de la siguiente forma:

$$\frac{At}{V_o} = \int_{C_{Bo}}^{C_{Bf}} \frac{\exp\left[-\int_{C_{Bo}}^{C_B} \frac{dC_B}{(C_B - C_P)} \right] dC_B}{J(C_B - C_P)} \tag{10.22}$$

Cuando la retención es total $C_P = 0$, entonces la ecuación (10.22) se simplifica a:

$$\frac{At}{V_o} = C_{Bo} \int_{\frac{1}{C_{Bf}}}^{\frac{1}{C_{Bo}}} \frac{1}{J}\, d\left(\frac{1}{C_B}\right) \tag{10.23}$$

La ecuación (10.23) puede ser utilizada para calcular el área necesaria para realizar una concentración de C_{Bo} a C_{Bf} en un tiempo t o para calcular dicho tiempo dada el área de UF disponible. Este cálculo requiere la evaluación de la parte derecha de la ecuación (10.23), lo cual puede realizarse utilizando un programa adecuado o calculando el área bajo la curva de los datos experimentales graficados como:

$$\left(\frac{1}{J}\right) \text{ vs } \left(\frac{1}{C_B}\right)$$

Para realizar estudios de escalamiento también puede utilizarse la expresión experimental de la variación del flux con C_B obtenida en equipos de laboratorio, conjuntamente con la ecuación 10.23.

Ejemplo 10.5. UF por lotes.

Se desea concentrar de 2 a 10 % en peso 10 m^3/dia de una solución de un polisacárido. Como el tiempo muerto (descarga, limpieza, etc.) de la unidad es de 4 h, el tiempo de operación es de 20 h.

Se realizan pruebas de laboratorio utilizando una unidad tubular de 0.012×1.2 m, por considerarse más conveniente este tipo de arreglo para el flux proyectado, y por las ventajas que ofrece para su limpieza por retrolavado.

Los datos de laboratorio muestran que para una $\Delta P = 1.5$ kg/cm^2 el gasto volumétrico en la recirculación es de 8 L/min y el flux en L/m^2−h está dado por la expresión:

$$J = 8 \ln\left(\frac{15}{C_B}\right)$$

Se pide calcular:

a) El área de UF necesaria.

b) El número de tubos necesarios (diseño modular).

c) El flux promedio.

Solución:

a) Cálculo de área. Con los datos y la ecuación (10.23) se obtiene la expresión:

$$A = 1000 \int_{\frac{1}{10}}^{\frac{1}{2}} \left[\frac{1}{8 \ln\left(\frac{15}{C_B}\right)}\right] d\left(\frac{1}{C_B}\right) = 1000 \int_{\frac{1}{10}}^{\frac{1}{2}} \frac{dx}{8 \ln(15x)}$$

En la Figura 10.22 se muestra la curva que se obtiene al graficar $1/J$ vs $1/C_B$. La integral de la expresión anterior es igual al área bajo esa curva dentro de los límites, de tal manera que:

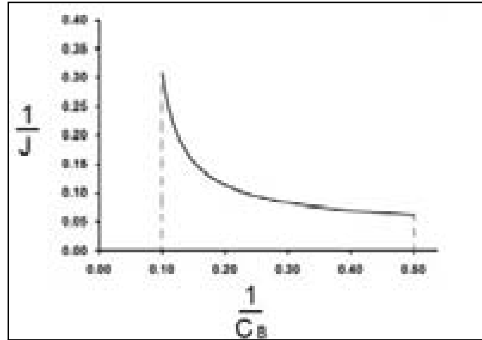


Figura 10.22: Curva de $(1/J)$ vs $(1/C_B)$. Datos de Ejemplo 10.5.

$$A = 1000 \times 0.04 \;\; \text{m}^2 = 40 \text{ m}^2$$

b) Cálculo del número de tubos N:

$$N = \frac{\text{Área total}}{\text{Área por tubo}} = \frac{40 \text{ m}^2}{\pi \times 0.012 \text{ m} \times 1.2 \text{ m}} = 884 \text{ tubos}$$

c) Cálculo del flux promedio. Mediante un balance de soluto se obtiene primero el volumen final de la solución:

$$V_o C_o = V_f C_f$$

de tal manera que,

$$V_f = \frac{10,000 \times 2 \text{ L}}{10} = 2000 \;\; \text{L}$$

con estos datos se puede calcular el flux promedio:

$$J_{prom} = \frac{(10,000 - 2000) \text{ L}}{40 \text{ m}^2 \times 20 \text{ h}} = 10 \;\; \frac{\text{L}}{\text{m}^2 - \text{h}}$$

Concentración continua

Los sistemas de UF continuos se utilizan para procesar volúmenes considerables o cuando se tiene una alimentación continua.

Debido a que un sistema continuo opera todo el tiempo a la concentración de salida deseada, si el sistema consta de una sola etapa, el área de UF necesaria es mucho mayor que si se opera en varias etapas en cascada. Debido a esto los sistemas de multietapas continuas son los más utilizados.

Si un sistema de UF consta de varias etapas de igual área, conforme la concentración de soluto aumenta en cada etapa el flux de permeado disminuye. Entre más etapas presenta la cascada mayor es el flux promedio en ésta. Sin embargo, el incremento en el flux promedio disminuye conforme aumenta el número de etapas, tendiendo a alcanzar el flux promedio de un sistema por lotes. Generalmente es más económico utilizar de tres a cinco etapas (Tutunjian, 1985b).

Algunas cascadas de UF operan con áreas diferentes en arreglos tipo pirámide, donde el área por etapa disminuye conforme la concentración de soluto aumenta, es decir el volumen de solución disminuye.

En el sistema de UF continua que se muestra en la Figura 10.23, cada etapa está constituida por una o varias unidades de UF en serie o paralelo. El problema de diseño consiste en determinar el área de UF de cada etapa, para un flujo de entrada F_o, con una concentración de la solución de entrada C_o y una concentración de salida deseada C_n.

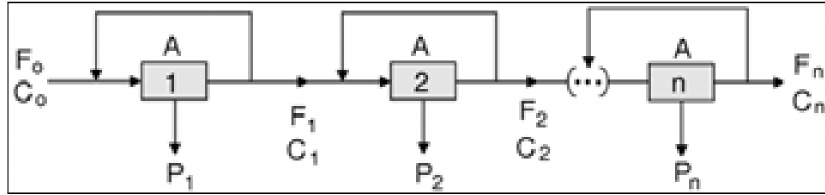


Figura 10.23: UF continua de etapas múltiples.

Si se supone un coeficiente de retención $\sigma = 1$ para todas las etapas, el área de cada etapa puede calcularse utilizando balances de masa solamente.

El flujo F_n puede calcularse efectuando un balance de masa de soluto en toda la cascada, de tal manera que,

$$F_n = \frac{F_o C_o}{C_n} \tag{10.24}$$

El flux en la etapa n está dado por una expresión de la forma:

$$J_n = k_s \ln\left(\frac{C_G}{C_n}\right) \tag{10.25}$$

El flujo de permeado P_n en la etapa n se puede calcular para un área A de diseño con,

$$P_n = AJ_n \tag{10.26}$$

Efectuando un balance global en la etapa n se puede calcular el flujo de la etapa previa,

$$F_{n-1} = P_n + F_n \tag{10.27}$$

Por medio de un balance de soluto en la etapa n se calcula la concentración de soluto en la etapa previa,

$$C_{n-1} = \frac{F_n C_n}{F_{n-1}} \tag{10.28}$$

Con el sistema de ecuaciones (10.24)-(10.28), en forma iterativa descendente se calcula el número de etapas necesarias hasta alcanzar el valor de la concentración de soluto de la solución de entrada, cuando se conoce el área de cada etapa; o bien el área necesaria para un número de etapas prefijado.

Ejemplo 10.6. Comparación de UF por lotes y continua.
Se desea procesar 5000 L/h de una solución proteica para concentrarla de 2 a 20 % en peso. Las pruebas experimentales muestran que el flux puede estimarse con la expresión

$$J = 20 \ln\left(\frac{30}{C_B}\right)$$

Se pide calcular:
a) El área necesaria para un procesamiento por lotes y el flux promedio.
b) El área necesaria para un procesamiento continuo de 5 etapas y el flux promedio.
c) La variación del área total de la UF con el número de etapas.

Solución:
a) Área UF por lotes. Utilizando la ecuación (10.23) se puede llegar a la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} A_{\text{por lotes}} &= 10,000 \times \int_{\frac{1}{20}}^{\frac{1}{2}} \left[\frac{1}{20 \ln\left(\dfrac{30}{C_B}\right)}\right] d\left(\frac{1}{C_B}\right) \\ A_{\text{por lotes}} &= 10,000 \times 0.0134 \ \ \text{m}^2 = 134 \ \text{m}^2 \end{aligned}$$

El flux promedio está dado por:

$$J_{\text{prom}} = \frac{\left(5000 - \dfrac{5000 \times 2}{20}\right) \dfrac{\text{L}}{\text{h}}}{134 \ \text{m}^2} = 33.58 \ \frac{\text{L}}{\text{m}^2 - \text{h}}$$

b) El área/etapa para 5 etapas y el flux promedio. En la Tabla 10.6 se presentan los cálculos utilizando las ecuaciones (10.24)-(10.28), donde la relación Área/etapa = 32.875 m^2 satisface la condición de diseño.

Tabla 10.6: Área para procesamiento continuo en 5 etapas. Datos del Ejemplo 10.6.

n	F_n (L/h)	C_n (% en peso)	J_n (L/m^2–h)	P_n (L/h)
5	500.00	20.00	8.11	266.59
4	766.59	13.04	16.66	547.57
3	1314.17	7.61	27.44	901.97
2	2216.14	4.51	37.89	1245.55
1	3461.69	2.89	46.81	1538.79
0	5000.00	2.00		
			Total	4,500.00

El área total es:

$$A_{\text{cont}} = (5)(32.875)\ \text{m}^2 = 164.375\ \text{m}^2$$

El flux promedio es:

$$J_{\text{prom}} = \frac{4500\ \dfrac{\text{L}}{\text{h}}}{164.375\ \ \text{m}^2} = 27.38\ \frac{\text{L}}{\text{m}^2 - \text{h}}$$

c) Variación del área total. Utilizando el procedimiento del inciso b) se realizan los cálculos para obtener la Tabla 10.7.

Tabla 10.7: Cálculos para diferentes número de etapas. Datos Ejemplo 10.6.

Número de etapas totales	Área por etapa (m^2)	Área total (m^2)	Flux promedio (L/m^2–h)
1	555.00	555.00	8.11
2	119.22	238.44	18.87
3	63.98	191.94	23.44
5	32.88	164.37	27.38
10	14.77	147.74	30.45

La Figura 10.24 muestra estos resultados en forma gráfica.

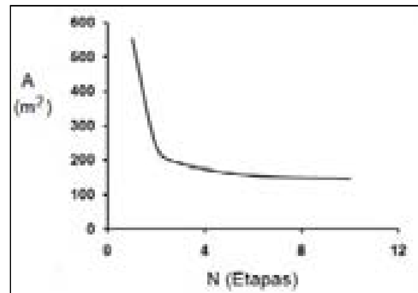


Figura 10.24: Variación del área total de UF con el número de etapas. Datos del Ejemplo 10.6.

Diafiltración por lotes: a volumen constante

En la diafiltración por lotes a volumen constante (Fig. 10.18b) se alimenta continuamente solución de lavado al tanque de alimentación y se mantiene el volumen del retenido constante, de tal manera que el flujo de alimentación es igual al flujo de permeado.

Considerando que el soluto de interés es totalmente rechazado por la membrana y la impureza totalmente permeable, el balance del soluto que se desea eliminar en el sistema, está dado por:

$$V_R \frac{dC_I}{dt} = -PC_I \tag{10.29}$$

donde:

V_R: Volumen retenido en el tanque. $[L^3]$.

C_I: Concentración de impureza en el tanque. $[M/L^3]$.

P: Flujo de permeado. $[L^3/t]$.

Dado que en la operación V_R es constante, el flujo de permeado puede igualarse al flujo de solución de lavado, entonces:

$$V_R \frac{dC_I}{dt} = -C_I \frac{dV_D}{dt} \tag{10.30}$$

donde V_D es el volumen de solución de lavado de diafiltración.

La ecuación 10.30 puede integrarse con los límites,

$$\begin{aligned} C_I &= C_{Io} \qquad V_D = 0 \\ C_I &= C_I \qquad V_D = V_D \end{aligned}$$

obteniéndose la expresión siguiente:

$$C_I = C_{Io} \exp\left(-\frac{V_D}{V_R}\right) \tag{10.31}$$

La ecuación anterior puede ser rearreglada expresando el flux de permeado como:

$$J = \frac{V_D}{At} \tag{10.32}$$

de tal manera que,

$$C_I = C_{Io} \exp\left(-\frac{JAt}{V_R}\right) \tag{10.33}$$

dado que el flux de permeado también puede expresarse de la siguiente forma:

$$J = k_s \ln\left(\frac{C_G}{C_B}\right) \tag{10.34}$$

al combinar las ecuaciones (10.33) y (10.34) se obtiene:

$$C_I = C_{Io} \exp\left[\frac{-k_s At \ln\left(\frac{C_G}{C_B}\right)}{V_R}\right] \tag{10.35}$$

La ecuación (10.35) puede ser utilizada para calcular el área de diafiltración necesaria para lograr un determinado grado de eliminación de impurezas.

Ejemplo 10.7. Diafiltración por lotes a volumen constante.

Se desea purificar por diafiltración por lotes a volumen constante 5000 L de una solución que contiene 15 % en peso de proteínas y 3 % de sal (O'Sullivan *et al.,* 1984). El flux del sistema está dado por:

$$J = 20 \ln\left(\frac{30}{C_B}\right) \quad \left[\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{m}^2 - \mathrm{h}}\right]$$

Se pide:

a) Calcular el efecto sobre la pureza de la solución, de la razón del volumen de diafiltración a volumen de retenido o índice de lavado.

b) Calcular el área de diafiltración necesaria para lograr una pureza del 99 % en un tiempo de 10 h.

c) El volumen de solución de lavado de diafiltración para el inciso b).

Solución:

a) Variación de la pureza con el índice de lavado. Utilizando la ecuación (10.31) se pueden obtener los resultados que se presentan en la Tabla 10.8.

b) Área de diafiltración. Utilizando la ecuación (10.35) y los datos se tiene que:

Tabla 10.8: Efecto del volumen de diafiltración sobre la concentración de impurezas. Datos del Ejemplo 10.7.

V_D/V_R	C_I	C_B	$C_I + C_B$	Pureza $= \dfrac{C_B}{C_I + C_B}$
0	3.00	15	18.00	0.833
1	1.10	15	16.10	0.932
2	0.41	15	15.41	0.973
3	0.15	15	15.15	0.990
4	0.05	15	15.05	0.996

$$0.05 = \exp\left[\frac{-20(A)(10\text{ h})\ln\left(\dfrac{30}{15}\right)\ \dfrac{\text{L}}{\text{m}^2-\text{h}}}{5000\text{ L}}\right]$$

de donde se obtiene:

$$A = 108\text{ m}^2$$

c) Volumen de diafiltración. La ecuación (10.32) puede ser usada para calcular V_D, de tal manera que:

$$V_D = JAt = \left[20\ln\left(\frac{30}{15}\right)\frac{\text{L}}{\text{m}^2-\text{h}}\right]\left(108\text{ m}^2\right)(10\text{ h}) = 15{,}000\ \ \text{L}$$

Diafiltración por lotes repetida

Una forma alternativa de diafiltración por lotes consiste en adicionar un volumen de líquido de lavado al tanque de proceso que contiene un volumen V_R de solución, y lavar hasta alcanzar nuevamente el volumen V_R. Esta operación se repite hasta alcanzar la pureza deseada.

El balance de masa para esta operación cuando la impureza es totalmente permeable se puede expresar como:

$$\frac{C_{In}}{C_{Io}} = \frac{1}{\left(1+\dfrac{V_L}{V_R}\right)^n} \tag{10.36}$$

donde:

C_{In}: Concentración de impurezas después de n lavados.

C_{Io}: Concentración inicial de impurezas.

V_L: Volumen de líquido de lavado empleado.

n: Número de lavados.

V_R: Volumen de retenido.

Diafiltración continua en cascada

En la diafiltración continua en cascada el líquido de lavado se adiciona continuamente en cada etapa (Fig. 10.25). Este tipo de arreglo es útil para procesar volúmenes considerables o cuando por inestabilidad del producto se requieren tiempos de operación cortos.

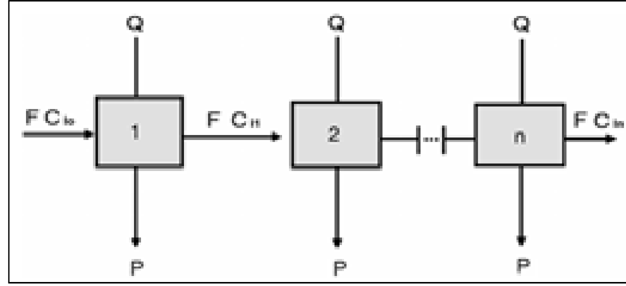


Figura 10.25: Diafiltración continua en cascada.

Cuando la concentración de la especie retenida es constante, existe un flux constante en cada etapa (flujo de líquido de lavado igual al flujo de permeado). Además, si la membrana no retiene la impureza, la concentración de ésta a la salida de cada etapa y en el permeado es la misma, de tal manera que el balance de masa para la primera etapa puede ser expresado (con $Q = P$) como:

$$FC_{Io} = FC_{I1} + QC_{I1} \tag{10.37}$$

o bien como:

$$C_{I1} = \frac{C_{Io}}{\left(1 + \dfrac{Q}{F}\right)}$$

La concentración de soluto a la salida de la etapa n puede ser expresada como:

$$C_{In} = \frac{C_{Io}}{\left(1 + \dfrac{Q}{F}\right)^n} \tag{10.38}$$

donde:

C_{In}: Concentración de impureza en la etapa n.

Q: Flujo de líquido de lavado.

F: Flujo de alimentación (retenido).

P: Flujo de permeado.

La ecuación (10.38) también puede expresarse como:

$$C_{In} = \frac{C_{Io}}{\left(1 + \frac{V_D}{V_R}\right)^n} \tag{10.39}$$

donde V_D es el volumen de lavado alimentado a una etapa y V_R el volumen de retenido alimentado al sistema en un tiempo dado.

Como el flux de permeado en cada etapa está dado por:

$$J = \frac{V_D}{At}$$

la ecuación (10.39) se puede rearreglar de la siguiente forma:

$$At = \frac{\left[\left(\frac{C_{Io}}{C_{In}}\right)^{1/n} - 1\right] V_R}{J} \tag{10.40}$$

donde A es el área de UF por etapa.

El producto At es mínimo cuando el lado derecho de la ecuación (10.40) es mínimo.

De acuerdo a la ecuación (10.39) al aumentar el índice de lavado V_D/V_R se incrementa la purificación. De acuerdo a la ecuación (10.40) el área necesaria para efectuar una determinada purificación disminuye al incrementar el número de etapas, o bien el incremento del número de etapas reduce la cantidad de líquido de lavado y el área necesaria por etapa.

Ejemplo 10.8. Comparación entre la diafiltración por lotes y la continua.

Se desea efectuar un análisis comparativo entre la diafiltración por lotes y la continua.

Se pide: Determinar que operación requiere menor volumen de lavado (menor área) para alcanzar un mismo porcentaje de eliminación de impurezas.

Solución:

Se pueden utilizar las ecuaciones (10.31) y (10.39) para efectuar este análisis, definiendo las expresiones del grado de eliminación de impurezas siguientes:

Para la operación por lotes:

$$\frac{C_{Io} - C_I}{C_{Io}} = 1 - \frac{C_I}{C_{Io}} = 1 - \exp\left(-\frac{V_D}{V_R}\right)$$

Para la operación continua:

$$\frac{C_{Io} - C_{In}}{C_{Io}} = 1 - \frac{C_{In}}{C_{Io}} = 1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{V_D}{V_R}\right)^n}$$

De acuerdo a lo anterior si $V_{DT}/V_R = 2$ el % de eliminación de impurezas es:

Operación por lotes:

$$\left(1 - e^{-2}\right) \times 100 = 86.5\,\%$$

Operación continua 1 etapa:

$$\left[1 - \frac{1}{(1+2)^1}\right] \times 100 = 66.7\,\%$$

Operación continua 2 etapas:

$$\left[1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{2}{2}\right)^2}\right] \times 100 = 75.0\,\%$$

Operación continua 3 etapas:

$$\left[1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{2}{3}\right)^3}\right] \times 100 = 78.4\,\%$$

En la Tabla 10.9 se presentan los cálculos para otras relaciones de V_{DT}/V_R los cuales se muestran en forma gráfica en la Figura 10.26.

Es necesario hacer notar que V_{DT} es el volumen total de líquido de lavado, por lo que en el caso de la operación continua dicho volumen se reparte equitativamente entre las etapas. La operación por lotes es la que requiere menor volumen de lavado (área), entonces cuando ésto sea el objetivo de la operación debe seleccionarse este tipo de operación.

Diafiltración a contracorriente

En la diafiltración a contracorriente (Fig. 10.27) es posible lograr una mayor purificación con menos líquido de lavado, sin embargo, esto depende de la concentración alcanzable de la especie no permeable (Fane y Radovich, 1990).

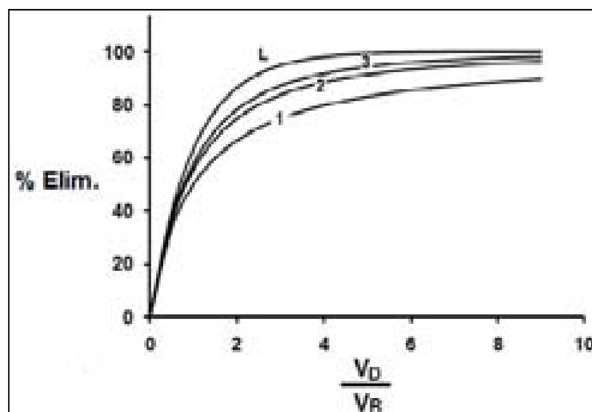


Figura 10.26: Comparación de diafiltración intermitente y continua. Datos del Ejemplo 10.8. (L) intermitente, (1) continua 1 etapa, (2) continua 2 etapas y (3) continua 3 etapas.

Operaciones combinadas: concentración-diafiltración

Algunos caldos requieren tanto ser concentrados como lavados, en estos casos se requiere decidir cuando efectuar la diafiltración. Si ésta se inicia con el caldo inicial, el flux se maximiza, sin embargo la cantidad de líquido de lavado también es la máxima bajo estas condiciones (ecuaciones 10.31 o 10.39). Por otro lado, si el caldo se concentra al valor deseado y posteriormente se lava, la cantidad de líquido de lavado disminuye, sin embargo el flux también disminuirá dado que éste varía inversamente a la concentración del soluto impermeable C_B (ecuación 10.34). Este comportamiento origina un problema de optimización, donde la diafiltración deberá efectuarse en un punto intermedio entre la concentración inicial y final de retenido.

Ejemplo 10.9. Operaciones combinadas de UF.

Se desea concentrar 10 veces un volumen de 1000 L de un caldo que contiene 2 % en peso de proteína y 5 % en peso de sales, de tal manera que se obtenga una concentración final de 20 % en peso de proteína. Se desea también reducir la concentración de sales al 0.05 %. El flux para el sistema está dado por la relación experimental.

$$JA = 500 \ln \left(\frac{27}{C_B} \right) \qquad \left[\frac{\text{L}}{\text{h}} \right]$$

Se pide: Encontrar el tiempo de diafiltración óptimo.

Solución:

Empleando la ecuación (10.31) se puede calcular la relación del volumen de líquido de diafiltración a volumen del caldo.

Tabla 10.9: Comparación de diafiltración intermitente y continua. Datos del Ejemplo 10.8.

V_{DT}/V_R	% de eliminación de impurezas		
	Intermitente	Continua		
		1	2	3
0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	86.5	66.7	75.0	78.4
4	98.2	80.0	88.9	92.1
6	99.8	85.7	93.8	96.3
8	100.0	88.9	96.0	98.0
10	100.0	90.9	97.2	98.8

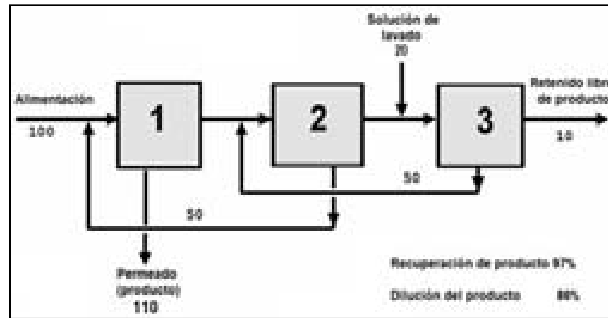


Figura 10.27: Diafiltración a contracorriente. Fuente: Fane y Radovich, 1990.

$$\frac{V_D}{V_R} = \ln\left(\frac{C_{Io}}{C_I}\right) = \ln\left(\frac{5}{0.05}\right) = 4.6$$

Esta relación debe ser utilizada independientemente del volumen de caldo V_R. Por otro lado, V_R depende del grado de concentración previa a la diafiltración. Utilizando la expresión de flux se puede calcular el tiempo de diafiltración de acuerdo a la siguiente expresión:

$$t = \frac{V_D}{JA} = \frac{4.6V_R}{500 \ln\left(\dfrac{27}{C_B}\right)}$$

La ecuación anterior puede expresarse en términos de X veces que se concentra la solución original de 1000 L y 2 % de proteína.

$$t = \frac{4.6\left(\dfrac{1000}{X}\right)}{500 \ln\left(\dfrac{27}{2X}\right)}$$

En la Tabla 10.10 se muestra el efecto del factor de concentración sobre los diferentes parámetros.

Tabla 10.10: Operaciones combinadas. Datos del Ejemplo 10.9.

X	V_R (L)	V_D (L)	C_B (%)	JA (L/h)	t (h)
1	1000.00	4600.00	2.00	1301.34	3.53
2	500.00	2300.00	4.00	954.77	2.41
3	333.33	1533.33	6.00	752.04	2.04
4	250.00	1150.00	8.00	608.20	1.89
5	200.00	920.00	10.00	496.63	1.85
6	166.67	766.67	12.00	405.47	1.89
7	142.86	657.14	14.00	328.39	2.00
8	125.00	575.00	16.00	261.62	2.20
9	111.11	511.11	18.00	202.73	2.52
10	100.00	460.00	20.00	150.05	3.07
11	90.91	418.18	22.00	102.40	4.08

La Figura 10.28 muestra la variación del tiempo de filtración con el factor de concentración, observándose un mínimo en $X = 5$ con $t = 1.85$ h.

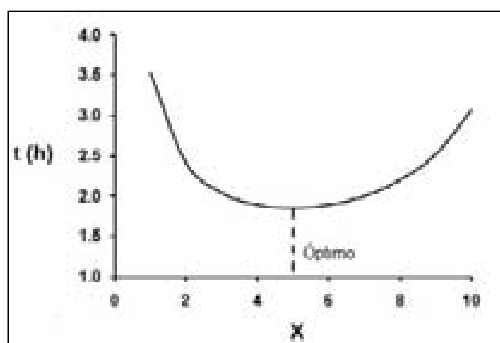


Figura 10.28: Operación de UF combinada. Datos del Ejemplo 10.9.

Los resultados anteriores conducen a proponer el siguiente esquema de concentración - diafiltración:

1. Concentrar 5 veces hasta 10 % de proteína y 5 % de sales.
2. Diafiltrar hasta 0.05 % de sales.
3. Concentrar 2 veces hasta 20 % de proteína.

Se supone que el tiempo total de concentración no se afecta por el esquema de diafiltración que se adopte.

10.5. Sumario

La ultrafiltración se utiliza para concentrar y purificar caldos biológicos mediante el uso de membranas especializadas para lograr la separación deseada. Los equipos de ultrafiltración presentan características distintivas en arreglos modulares de varios tipos que operan bajo la modalidad de flujo cruzado de la alimentación. Las operaciones pueden ser efectuadas en forma intermitente o continua ya sea para concentrar, purificar o diafiltrar una solución.

El diseño de los equipos de ultrafiltración está basado en una combinación de la teoría y la experimentación, para estimar áreas de los equipos, las etapas necesarias o el tiempo requerido de un proceso.

10.6. Problemas

10.1. **UF con polarización y gel.** En la concentración de una solución de Factor VIII antihemofílico utilizando módulos de fibra hueca (Mitra y Ng, 1986), se obtuvieron los siguientes datos:

C_B(mg/mL)	J (mL/cm^2−s) $\times 10^5$
5	15.1
10	12.0
20	11.0
30	8.5
40	7.0
50	6.5

Se pide: Estimar k_s y C_G.

10.2. Diafiltración óptima. Demostrar que la concentración de un soluto impermeable para la cual el tiempo de diafiltración es mínimo en un proceso combinado, está dada por:

$$C = \frac{C_G}{e}$$

donde e es la base de los logaritmos naturales.

10.3. **Concentración y diafiltración.** Se desea concentrar 75,000 L de una solución proteica del 2 al 15 % en peso y reducir su contenido de sales 5 veces. El tiempo de proceso es de 12 horas y la expresión experimental del flux es:

$$J = 12 \ln\left(\frac{40}{C_B}\right) \qquad \left[\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{m}^2 - \mathrm{h}}\right]$$

Se pide:
a) Calcular el área mínima para una operación por lotes a volumen constante.
b) Calcular el área total para una operación continua en cascada con 3 etapas de igual área.
Resp. a) 321 m^2 y b) 410 m^2.

10.4. **UF en fibras huecas.** Al procesar un lote de 2.9 L de un caldo que contiene 23.77 g/L de *B. megatherium* en una unidad de fibra hueca de 0.0316 m^2 de área, la solución se concentra 5.3 veces en 14 min.
Se pide:
a) Calcular la concentración final del caldo.
b) Calcular el flux promedio de la operación.
Resp. a) 0.547 L y b) 319 L/m^2−h.

10.5. **UF en paralelo.** Una planta produce Cefamicina C mediante una fermentación a un ritmo de 28 lotes de $57,000$ L cada semana. El caldo con sólidos en suspensión se procesa en un sistema que consta de cuatro unidades de UF de 268 m^2 cada una. El flujo de permeado promedio que produce cada unidad es de 76 L/min. El coeficiente de retención de la Cefamicina C en la unidad puede considerarse igual a cero.

Para obtener una recuperación del 98 % de Cefamicina la operación se efectúa en dos pasos: i) primero se reduce el volumen del caldo a la tercera parte y ii) posteriormente se diafiltra a la velocidad final de permeación del primer paso.

Se pide:

a) El tiempo requerido para procesar cada lote considerando un tiempo muerto de cuatro horas por día.

b) El flujo que es procesado por unidad.

c) El tiempo necesario para el primer paso del proceso.

d) El porcentaje de recuperación de Cefamicina C en el primer paso.

e) El volumen de diafiltración.

f) El flujo de permeado por unidad en la diafiltración.

Resp. a) 5 h/lote, b) 47.5 L/min, c) 125 min, d) 66 %, e) $V_D = 53,455$ L y f) $JA = 74.24$ L/min.

10.6. UF tubular. En una unidad tubular de UF donde se concentra a razón de 2 L/min una solución que contiene 30 mg/L de una proteína de peso molecular de 300,000 Da, el flux está dado por:

$$J = 5 \times 10^{-4} \ln\left(\frac{100}{C_B}\right) \qquad \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2 - \text{s}}\right]$$

La presión de entrada a la unidad es de 2 atm. El tubo presenta un diámetro interno de 2 cm y una longitud de 50 cm. La caída de presión a lo largo del tubo está dada por:

$$\Delta P = \frac{0.001\ LQ^2}{d^5}$$

donde:

ΔP: caída de presión en atmósferas; L: longitud del tubo en cm; Q: flujo cruzado en cm^3/s; d: diámetro del tubo en cm.

Se pide calcular:

a) La presión a la salida del tubo.

b) La caída de presión transmembrana.

c) El flux de permeado.

Resp. a) 0.264 atm, b) 1.132 atm y c) 146 L/m^2−h.

10.7. **Estudio comparativo.** Se desea comparar dos tipos de membranas para desalar y concentrar una solución de proteasas (Ghose, 1990). Los coeficientes de retención de las membranas son los siguientes:

Membrana	Soluto	Coeficiente
PM-10	Proteasas	0.99
	Sales	0.00
PM-30	Proteasa	0.80
	Sales	0.00

El volumen a procesar es de 10^{-2} m^3 con una concentración de 0.1 kg/m^3 de proteasas y 4×10^2 mol/m^3 de $NaCO_3$.

Se pide determinar para cada tipo de membrana:

a) El volumen necesario de agua destilada para eliminar el 99 % de sales por diafiltración a volumen constante.

b) Las pérdidas de proteasas durante la diafiltración.

c) La concentración de proteasas al final de la diafiltración.

d) Las pérdidas de proteasas al concentrar 10 veces la solución diafiltrada.

e) El porcentaje de pérdidas totales de proteasas.

Respuestas para la membrana PM-10.

Resp. a) 4.6×10^{-2} m^3, b) 4.5×10^{-5} m^3, c) 0.0955 kg/m^3 y e) 6.69 %.

10.8. UF de suero. Se utiliza una unidad tubular de UF para concentrar suero de leche. En ausencia de proteína se puede obtener un flux en la membrana de 100 L/m^2−h, cuando la presión transmembrana es de 0.4 atm. Las proteínas del suero tienen una difusividad promedio de 4×10^{-7} cm^2/s y producen una presión osmótica en *atm* que se correlaciona con la ecuación de Jonsson,

$$\Delta\pi = 4.4 \times 10^{-3}C - 1.7 \times 10^{-6}C^2 + 7.9 \times 10^{-8}C^3$$

donde C es la concentración de proteína en g/L. El coeficiente de transferencia de masa en el sistema se ha estimado en 7.8×10^{-4} cm/s.

Se pide:

a) Calcular el coeficiente de permeabilidad L_p para el transporte de agua a través de la membrana.

b) Calcular el efecto de la presión transmembrana sobre el flux si la concentración de proteína es de 10 g/L y la proteína es rechazada totalmente por la membrana.

Resp. a) 250 L/m^2−h−atm y b) pista: graficar J en el intervalo de 10 a 100 L/m^2−h vs ΔPTM (atm).

10.9. Concentración de leche. Una aplicación industrial de la ultrafiltración es la concentración de leche para la fabricación de quesos tipo mozzarella, feta, brie, cottage, entre otros.

Se ha encontrado que toma 24.7 min procesar 1, 000 L de leche utilizando 100 m^2 de membrana a una velocidad promedio del fluido de 100 cm/s, cuando el flux es independiente de la presión transmembrana.

Se pide: Calcular la velocidad necesaria del fluido si se reprograma la operación para procesar los 1, 000 L de leche en 60 min.

Resp. 6.97 cm/s.

10.10 Escalamiento de UF. Durante la elución de una columna de intercambio iónico se obtiene una solución que contiene 1.5 g/L de la proteína recombinante RP-I. Se desea concentrar esta solución hasta 20.0 g/L, en una operación de UF por lotes con flujo tangencial en una membrana de polisulfona de tamaño de corte de $30,000$ Da.

A nivel laboratorio en una membrana de 100 cm^2 se produce un flux de 100 L/m^2-h a la concentración inicial de la solución. Este flujo no se incrementó cuando se elevó la presión transmembrana a más de 5 atm, cuando la velocidad del fluido era 1.0 m/s. La literatura sugiere que al incrementarse la concentración en la solución a las mismas condiciones de operación el flux se hace cero cuando la RP-I alcanza 200 g/L.

Para el desarrollo del proceso se cuenta con un equipo piloto de UF de 1.0 m^2 de área, que puede ser operado a la mismas condiciones que el equipo de laboratorio.

Se pide:

a) Calcular el promedio del flux inicial y final, durante la concentración de RP-I de 1.5 a 20.0 g/L en el equipo piloto.

b) Estimar el tiempo necesario para concentrar 100 L de solución en el equipo piloto.

Resp. a) 61.5 L/m^2-h y b). 1.2 h.

10.7. Bibliografía

Belfort, G. **1987**. Membrane separations technology: An overview. *Ad. Biochem. Engin.* Bungay, H.R.; Belfort, G. (Eds.). John Wiley and Sons. New York. 10, 239-297.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley and Sons. 9, 237-270.

Bird, R.B.; Stewart, W.E.; Lightfoot, E.N. **2002**. *Transport Phenomena.* John Wiley and Sons. New, York. 2da Edición. p. 92.

Brocklebank, M.P. **1990**. Downstream processing plant and equipment. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.) New York. Marcel Dekker. 19, 617-740.

Dziezak, J.D. **1990**. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. *Food Technol.* 44, 108-113.

Fane, A.G.; Radovich, J.M. **1990**. Membrane Systems. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). New York. Marcel Dekker. 8, 209-262.

Ghose, T.K. **1990**. *Bioprocess Computations in Biotechnology.* Vol. 1. Ellis Horwood. New York. 9, 229-264.

Gravatt, D.P.; Molnar, T.E. **1986**. Recovery of an extracellular antibiotic by ultrafiltration. En: *Membrane Separations in Biotechnology.* Mc Gregor, W.C. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 4, 89-97.

Hanisch, W. **1986**. Cell harvesting. En: *Membrane Separations in Biotechnology.* Mc Gregor, W.C. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 3, 61-88.

Jaffrin, M.Y. **2008**. Dynamic shear-enhanced membrane filtration: A review of rotating disks,rotating membranes and vibrating systems. *J. Memb. Sc.* 324, 7-25.

Kovácsa, Z.; Discacciati, M.; Samhabera, W. **2009**. Modeling of batch and semi-batch membrane filtration processes. *J. Memb. Sc.* 327, 164–173.

Le M.S.; Howell, J.A. **1985** . Ultrafiltration. En: *Comprehensive Biotechnology.* Murray M.Y. (Ed.). Permagon Press. New York. 25, 383-409.

Lightfoot, E.N.; Root, T.W.; O'Dell, J.L. **2008**. Emergence of ideal membrane cascades for downstream processing. *Biotechnol. Prog.* 24, 599-605.

Mc Gregor, W.C. **1986**. Selection and use of ultrafiltration membranes. En: *Membrane Separations in Biotechnology.* Mc Gregor, W.C. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 1, 1-35.

Mitra, G.; Ng, R.K. **1986**. Practice of ultrafiltration-diafiltration in the plasma frationation industry. En: *Membrane Separations in Biotechnology.* Mc Gregor, W.C. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 6, 115-134.

Mhurchúa, J.N.; Foley, G. **2006**. Dead-end filtration of yeast suspensions: Correlating specific resistance and flux data using artificial neural networks. *J. Memb. Sc.* 281, 325-333.

O'Sullivan T.J.; Epstein, A.C.; Korchin S.R.; Beaton, N.C. **1984**. Applications of ultrafiltration in biotechnology. *Chem. Eng. Prog.* 80, 68–75.

Santos, J.A.L.; Mateus, M.; Cabral, J.M.S. **1991**. Pressure driven membrane processes. En: *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology.* Costa, C.A.; Cabral, J.M.S. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 177-205.

Serra, C.A.; Wiesner, M.R. **2000**. A comparison of rotating and stationary membrane disk filters using computational fluid dynamics. *J. Memb. Sc.* 165, 19-29.

Tutunjian, R.S. **1985a**. Scale-up considerations for membrane processes. *Bio/-Technology.* 3, 615-626.

Tutunjian, R.S. **1985b**. Ultrafiltration processes in biotechnology. En: *Comprehensive Biotechnology.* Murray M.Y. (Ed.). Permagon Press. New York. 26, 411 - 437.

van Reis, R.; Zydney, A. **2007**. Bioprocess membrane technology. *J. Memb. Sci.* 297, 16–50.

Capítulo 11

Electroforesis

11.1. Introducción

Electroforesis es el movimiento de las partículas cargadas contenidas en un medio debido a la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis constituye una de las técnicas más poderosas para la purificación de moléculas biológicas.

Gran parte de la teoría y de los equipos de electroforesis han sido desarrollados para ser utilizados en la separación de proteínas globulares, sin embargo pueden ser aplicados igualmente a otro tipo de proteínas, así como a ácidos nucleicos, células o partículas coloidales.

En la separación de proteínas por medio de un campo eléctrico, la carga y la naturaleza anfotérica de éstas juega un papel fundamental. Sin embargo, existen otros factores tanto microscópicos como macroscópicos que afectan el movimiento de una partícula en un campo eléctrico, que han conducido al desarrollo de diferentes formas y técnicas para el desarrollo de las separaciones electroforéticas. Estos aspectos fundamentales de la electroforesis se revisan en la sección 11.2 de este capítulo.

La electroforesis no está limitada a la escala analítica. Actualmente existen varios tipos de equipo en diversos arreglos que permiten el uso de esta técnica a escala preparativa. En la sección 11.3 se presenta una descripción general de este tipo de equipos.

La sección 11.4 presenta una discusión sobre los principios básicos del diseño de equipos de electroforesis.

11.2. Fundamentos

La forma más sencilla de realizar una operación de electroforesis es el método de electroforesis de zona (Fig. 11.1). En este método se coloca una pequeña banda de muestra de la solución que contiene el soluto de interés, sobre una matriz generalmente rectangular, de celulosa, almidón, agar o poliacrilamida, la

cual se encuentra inmersa en un electrolito que sirve como buffer. Dichas matrices tienen la propiedad de constituir medios porosos altamente hidratados, que proporcionan resistencia mecánica y disminuyen los efectos del calor generado por el paso de corriente al aplicar el gradiente de potencial a la celda.

En la electroforesis de zona cada componente de la mezcla se mueve a diferente velocidad, separándose los componentes de la mezcla sobre la matriz. Cuando esta técnica se utiliza con fines cualitativos, después de un tiempo apropiado para desarrollar la electroforesis, las matrices son teñidas para observar los componentes de la muestra.



Figura 11.1: Electroforesis de zona en un gel anticonvectivo. Fuente: Ivory, 1990.

En la discusión de la operación de electroforesis es importante considerar cuatro aspectos fundamentales:

- La naturaleza de la carga de la partícula que se mueve en el campo eléctrico.
- La velocidad de migración de la partícula que es el campo de estudio de la teoría electrocinética.
- Los fenómenos de dispersión de la muestra que se observan en las operaciones electroforéticas.
- Las técnicas y diversas formas en que es posible realizar una operación electroforética.

11.2.1. Carga y Punto Isoeléctrico de las Proteínas

En las proteínas su carga se origina principalmente de la ionización de sus numerosos grupos amino y carboxilo. Los grupos amino $-NH_2$ en medio ambientes ácidos son protonados produciendo grupos amonio $-\mathrm{NH}_3^+$. Los grupos carboxílicos $-\mathrm{COOH}$ en medios ambientales básicos son ionizados para formar grupos carboxilatos $-\mathrm{COO}^-$.

Tal como se muestra en la Figura 11.2, la carga neta de una proteína depende entre otros factores del pH al que ésta se encuentre. A un pH relativamente bajo existen más grupos $-NH_3^+$ y $-COOH$ y la proteína tiene una carga neta positiva; a un pH relativamente alto la proteína tiene más grupos $-NH_2$ y $-COO^-$ y se encuentra cargada negativamente. Existe un pH particular para cada proteína donde la carga neta de ésta es cero, a este pH se le conoce como punto isoeléctrico.

La carga que adquiere una proteína en determinado pH, así como el punto isoeléctrico de ésta, son dos propiedades que se utilizan para la correcta separación electroforética de proteínas.

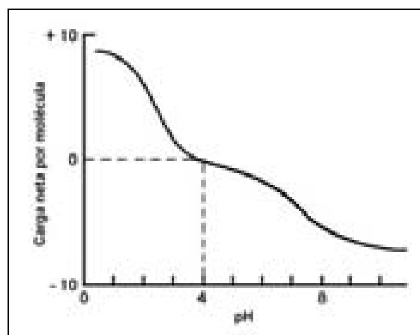


Figura 11.2: Cambio de la carga neta de un proteína con el pH. El punto isoeléctrico en este caso se alcanza a pH = 4.0.

11.2.2. Teoría Electrocinética

La velocidad de migración de un soluto a través de un líquido conductor por la acción de un campo eléctrico, despreciando efectos gravitacionales y difusivos, está influenciada por algunos fenómenos físicos microscópicos como: la carga de la partícula, la fuerza de arrastre que se opone al movimiento de la partícula, y las fuerzas de relajación y de retardamiento que se producen en el ambiente iónico que rodea al soluto. La teoría electrocinética que ha sido desarrollada para el tratamiento de estos aspectos ha conducido a la elaboración de varios modelos, los cuales varían en su grado de complejidad. Dos modelos básicos de gran utilidad son: a) el modelo de una esfera cargada sumergida en un medio continuo y el modelo de la doble capa.

Modelo de una esfera cargada sumergida en un medio continuo

Un modelo sencillo para el tratamiento de la electroforesis consiste en considerar a la partícula de soluto, como si se tratara de una esfera cargada sumergida en un medio continuo de solvente.

Un balance de las fuerzas que actúan sobre la partícula cuando ésta se mueve a una velocidad constante (en equilibrio), despreciando los efectos difusivos y gravitacionales, establece que la fuerza que actúa sobre la partícula debida al campo eléctrico, es igual a la fuerza debida al arrastre de la partícula, es decir:

$$F_K = -F_E \tag{11.1}$$

La expresión de la fuerza cinética F_K en el caso de un flujo viscoso lento alrededor de una esfera (flujo reptante) se conoce como Ley de Stokes y está dada por (Bird *et al.,* 2002):

$$F_K = 3\pi\mu d\upsilon \tag{11.2}$$

donde:

υ: Velocidad terminal de la partícula. $[L/t]$.

μ: Viscosidad líquido. $[M/L-t]$.

d: Diámetro de la esfera. $[L]$.

La fuerza eléctrica F_E es proporcional tanto al campo que actúa sobre la partícula como a su carga, de tal manera que:

$$F_E = \frac{z_1\mathcal{F}E}{\overline{N}_o} \tag{11.3}$$

donde:

z_1: Valencia de la partícula o carga puntual.

$\mathcal{F}$: Constante de Faraday. [96,500 C/mol−equiv].

$\overline{N}_o$: Número de Avogadro. [z_1 iones/mol−equiv].

E: Campo eléctrico. [V/cm].

Si la partícula está en equilibrio es posible combinar las ecuaciones (11.1), (11.2) y (11.3) para obtener:

$$-\upsilon = \left(\frac{1}{3\pi\mu d}\right)\left(\frac{z_1\mathcal{F}E}{\overline{N}_o}\right) \tag{11.4}$$

En la expresión anterior $\overline{N}_o$ puede ser expresada en función de la constante de Boltzman k_B y la constante de los gases ideales R para obtener:

$$-\upsilon = \left(\frac{1}{3\pi\mu d}\right)\left(\frac{z_1 k_B\mathcal{F}E}{R}\right) \tag{11.5}$$

De acuerdo a la ecuación de Stokes-Eistein para un flujo reptante alrededor de una esfera, la difusividad D_{AB} está dada por:

$$D_{AB} = \frac{k_B T}{3\pi\mu d} \tag{11.6}$$

Combinando las ecuaciones (11.5) y (11.6) se tiene:

$$-v = \frac{D_{AB} z_1 \mathcal{F} E}{RT} \tag{11.7}$$

La movilidad m de una partícula en un campo eléctrico se define como la velocidad de la partícula por unidad de campo eléctrico,

$$m = \frac{v}{E} \tag{11.8}$$

En este caso particular del modelo de esfera, la movilidad está dada por:

$$m = \frac{D_{AB} z_1 \mathcal{F}}{RT} \tag{11.9}$$

Se ha observado experimentalmente que la movilidad de una partícula no depende sólo de su carga intrínseca, como predice modelo de esfera en la forma de la ecuación (11.9). El ambiente iónico que se forma alrededor de la partícula en solución tiene una influencia importante sobre la movilidad y las propiedades electrostáticas de la partícula. El modelo de la doble capa para interfases sólido-líquido electrolito, ha sido empleado para explicar estos efectos.

Modelo de la doble capa

El modelo de la capa doble desarrollado con base a la teoría de los electrolitos fuertes de Debye y Hückel, permite visualizar las interacciones de una partícula sólida cargada, con su microambiente iónico.

Las partículas como las proteínas cuando se encuentran presentes en soluciones de electrolitos desarrollan cargas. Estos grupos cargados atraen especies de la solución que presenten cargas contrarias (coiones, contraiones, moléculas polares o moléculas con dipolos inducidos, coiones solvatados o contraiones solvatados). El modelo de la doble capa propone que este conjunto de cargas genera dos regiones o capas con diferente grado de movilidad (Fig. 11.3).

Primera capa: superficie de corte En la primera región (capa de Sterm) la atracción que ejerce la partícula sobre las especies es más fuerte, formando una capa altamente hidratada, relativamente fija, de un espesor aproximado de 10 $\AA$. Esta capa que envuelve a la partícula misma, constituye la superficie de corte del complejo formado. Se considera a esta capa la responsable de la disminución del campo eléctrico intrínseco de la partícula.

Segunda capa Dependiendo de la carga neta que se genere dentro de la superficie de corte por acción del rearreglo de cargas, en las proximidades de la superficie de corte se genera una segunda capa de carga contraria (cuya naturaleza no es rígida), constituida por moléculas del solvente ligeramente ligadas y iones totalmente hidratados. A esta segunda capa se le conoce como capa difusa o capa de Gody-Chapman.

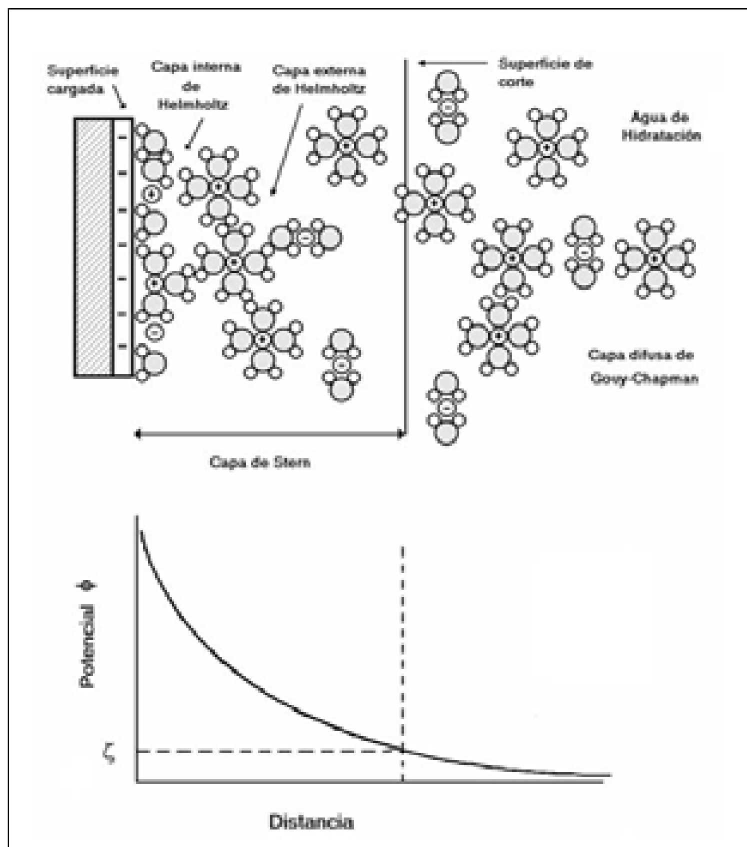


Figura 11.3: Esquema de la doble capa cerca de una superficie cargada. Adaptada de: Ivory, 1990.

Potencial Z El modelo de la doble capa permite interpretar el hecho que la velocidad de migración de una partícula cargada en un campo eléctrico, es proporcional al potencial Z de la partícula (ζ) y no a su carga intrínseca. El potencial Z es el potencial eléctrico medido en la superficie de corte de la partícula. El potencial ϕ disminuye exponencialmente dentro de la capa difusa. Actualmente no existen suficientes bases teóricas que permitan calcular el potencial Z

en función de la carga de la partícula y su determinación es de carácter empírico.

Radio medio de la capa difusa El radio de la capa difusa también tiene una influencia importante sobre la movilidad de la partícula. Utilizando la teoría de Debye-Hückel ha sido calculado el radio medio de la capa difusa o la longitud de Debye λ_D. Esta longitud varía inversamente con la raíz cuadrada de la fuerza iónica I (Castellan, 1971), es decir,

$$\lambda_D \propto \frac{1}{\sqrt{I}}$$

donde la fuerza iónica es una medida de la concentración y valencia de los iones que rodean la partícula, y está dada por:

$$I = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n} C_i z_i^2 \tag{11.10}$$

donde:

C_i: Concentración de la especie i.

z_i: Valencia de la especie i.

En la mayoría de los casos prácticos λ_D es menor a 1000 $\mathring{A}$.

En el caso de electrolitos simétricos y monovalentes,

$$C^+ = C^- = C_o; \quad z^+ = -z^- = z_o$$

se tiene:

$$\lambda_D = \left(\frac{\varepsilon RT}{2z_o^2\mathcal{F}^2C_o}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{11.11}$$

donde:

ε: Constante dieléctrica del medio. [$\mathrm{C^2/N{-}m^2 = F/m}$].

Efecto del espesor de la capa difusa sobre la movilidad Para analizar los efectos del espesor de la capa difusa sobre la movilidad de la partícula, es conveniente considerar tres casos particulares: a) con fuerzas iónicas bajas, es decir a concentraciones salinas bajas, la capa difusa es grande pero muy diluida en contra iones, de tal manera que su presencia puede ser ignorada, b) en ambientes de fuerzas iónicas altas, como los característicos de los líquidos fisiológicos (0.15 M), el espesor de la capa difusa es muy bajo ($\sim$ 2 $\mathring{A}$) y su presencia también puede ser ignorada y c) entre los dos extremos anteriores, se puede considerar la situación en la cual el espesor de la capa difusa es intermedio.

Modelo de la doble capa: movilidad en soluciones diluidas En soluciones diluidas la movilidad en función del potencial Z puede calcularse por medio de un balance de fuerzas sencillo, tal como el desarrollado para obtener la ecuación (11.9), de tal manera que en equilibrio

$$F_K = -F_E \tag{11.12}$$

siendo F_K la fuerza de arrastre sobre la partícula esférica formada por la superficie de corte, de tal manera que:

$$F_K = 3\pi\mu d_c \upsilon \tag{11.13}$$

La fuerza eléctrica F_E que actúa sobre la partícula es proporcional al campo que actúa sobre ésta y al potencial Z (que es una medida de la carga aparente de la misma).

De acuerdo con la Ley de Coulomb la fuerza entre dos cargas está dada por:

$$F_E = \frac{1}{\varepsilon}\frac{q_1 q_2}{r^2} \tag{11.14}$$

en este caso:

q_1: Carga aparente de la partícula. [C].

q_2: Carga correspondiente al campo. [C].

r: Distancia entre las cargas. [m].

ε: Constante dieléctrica del medio. [$C^2/N{-}m^2 = F/m$].

El potencial Z está dado por:

$$\zeta = \frac{1}{\varepsilon}\ \frac{q_1}{r_c} \tag{11.15}$$

donde r_c es el radio de corte de la partícula y q_1 es la carga neta de la partícula en la superficie de corte.

El campo aplicado a la partícula puede ser expresado como:

$$E = \frac{1}{\varepsilon}\frac{q_2}{r^2} \tag{11.16}$$

combinando las ecuaciones (11.14), (11.15) y (11.16) se obtiene:

$$F_E = \varepsilon\zeta r_c E \tag{11.17}$$

y las ecuaciones (11.12), (11.13) y (11.17) conducen a:

$$-6\pi\mu\upsilon = \varepsilon\zeta E \tag{11.18}$$

de tal manera que la movilidad $m = \upsilon/E$ está dada por la ecuación conocida como de Hückel,

$$m = \frac{\varepsilon\zeta}{6\pi\mu} \tag{11.19}$$

Esta movilidad es menor a la esperada si sólo se considera la carga real de la partícula y es aplicable cuando la relación de radio de corte a longitud Debye es muy pequeña ($r_c/\lambda_D << 1$).

Ejemplo 11.1. Cálculo del campo que genera un protón. La carga, radio y constante dieléctrica del medio para un protón son las siguientes:

$$\begin{aligned} q &= 1.6 \times 10^{-19} \text{ C} \\ r &= 31 \times 10^{-10} \text{ m} \\ \frac{1}{\varepsilon} &= \frac{1}{4\pi\varepsilon_o} = 9 \times 10^9 \ \frac{\text{N}-\text{m}^2}{\text{C}^2} \end{aligned}$$

Se Pide: Estimar el campo sobre la superficie de un protón:
Solución:
El campo está dado por la ecuación siguiente:

$$E = \frac{1}{4\pi\varepsilon_o}\frac{q}{r^2}$$

sustituyendo los datos se tiene:

$$\begin{aligned} E &= \left(9 \times 10^9 \ \frac{\text{N}-\text{m}^2}{\text{C}^2}\right)\left[\frac{1.6 \times 10^{-19} \text{ C}}{(31 \times 10^{-10})^2 \text{ m}^2}\right] \\ E &= 1.5 \times 10^8 \ \frac{\text{V}}{\text{m}} \\ E &= 1.5 \times 10^6 \ \frac{\text{V}}{\text{cm}} \end{aligned}$$

El campo que produce el protón debido a la relación de la carga con la distancia es muy grande. Una batería de 100 V produce un campo de sólo 10 V/cm.

Modelo de doble capa: movilidad en soluciones de concentración intermedia y alta Cuando la capa difusa presenta una longitud intermedia en el rango,

$$0.01 < \frac{r_c}{\lambda_D} < 1000$$

se observa experimentalmente una variación en la movilidad predicha por la ecuación (11.19), tal y como se representa en la Figura 11.4.

Esta variación ha sido correlacionada utilizando modelos basados en la ecuación de Henry, la cual establece que la movilidad de la partícula además de ser

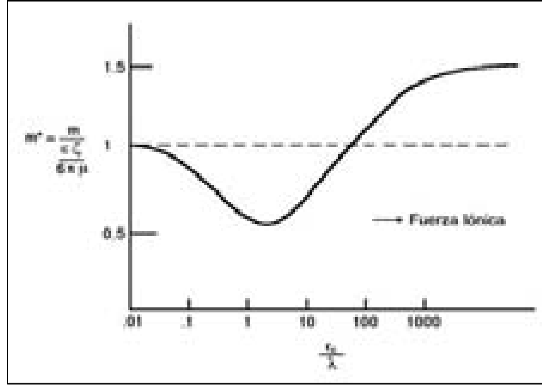


Figura 11.4: Variación de la movilidad con el radio de la capa difusa.

función del potencial Z y de la fuerza de arrastre, también es función de la relación del radio de corte a la longitud de Debye. Es decir,

$$m = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{6\pi\mu}\right)(m^*) = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{6\pi\mu}\right)\left[f\left(\frac{r_c}{\lambda_D}\right)\right] \tag{11.20}$$

Algunos modelos predicen reducciones en la movilidad de Hückel de hasta 60 % en el rango aproximado de

$$0.6 < \frac{r_c}{\lambda_D} < 6$$

Para relaciones de $r_c/\lambda_D >> 1$, los modelos predicen una solución asintótica donde:

$$f\left(\frac{r_c}{\lambda_D}\right) = \frac{3}{2}$$

de tal manera que:

$$m = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{6\pi\mu}\right)\left(\frac{3}{2}\right) = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\mu} \tag{11.21}$$

que es una movilidad 50 % mayor que la predicha por la ecuación de Hückel.

Fuerzas de relajación y retardamiento A nivel microscópico la variación de la movilidad ha sido explicada utilizando el modelo de doble capa y proponiendo los efectos conocidos como: a) fuerza de relajación y b) fuerza de retardamiento.

Cuando la partícula emigra en dirección opuesta a su carga neta, se presenta una distorsión de la capa difusa (Fig. 11.5). Los contraiones de la capa difusa tienden a emigrar en dirección opuesta creando un campo que se opone

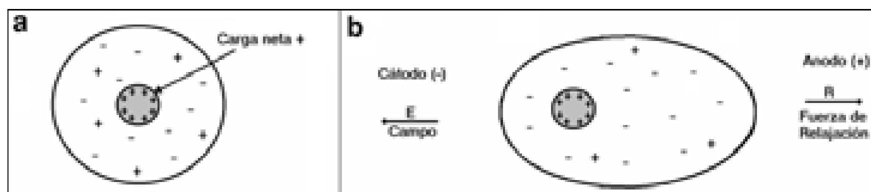


Figura 11.5: Representación esquemática del efecto de relajación. a) Partícula en medio y b) Partícula en campo eléctrico. Adaptada de: Rudge y Ladisch, 1986.

al movimiento de la partícula. La fuerza opuesta al movimiento de la partícula que se genera, se conoce como fuerza de relajación.

La fuerza de retardamiento se origina por el movimiento de solvente provocado por el movimiento de contraiones de la capa difusa, generándose un esfuerzo viscoso adicional sobre la superficie de corte de la partícula.

Los modelos electrocinéticos en general han presentado dificultades para predecir con exactitud los resultados de las separaciones electroforéticas. Sin embargo, han servido de base para generar diversos modelos empíricos de amplio uso.

11.2.3. Fenómenos de Dispersión

Cuando se realiza una operación de electroforesis se requiere que los solutos presentes en la solución de interés se separen formando bandas bien definidas, es decir se obtenga una resolución apropiada. Sin embargo, existen varios fenómenos que provocan la dispersión de la muestra, término que engloba tanto los efectos de difusión molecular, como los efectos microscópicos de mezclado que se agrupan en la llamada difusividad de remolino. Algunos de estos efectos se describen a continuación.

Difusión

En una electroforesis generalmente existe algo de dispersión de la mezcla debida a la difusión molecular, sin embargo este fenómeno normalmente no es la causa principal de la dispersión. De acuerdo a Jorgenson y Lukacs (Rudge y Ladisch, 1986), la desviación estándar de una muestra dispersada sólo por difusión está dada por:

$$\sigma = \sqrt{2D_{AB}t} \tag{11.22}$$

En el caso de proteínas la difusión puede ser estimada empleando la ecuación de Polson (Horstmann y Chase, 1989).

$$D_{AB} = 9.4 \times 10^{-11} \frac{T}{\mu (M_A)^{1/3}} \tag{11.23}$$

donde:

T: Temperatura. [°K].

M_A: Peso molecular del soluto. [Da]

μ: Viscosidad de la solución. [kg/m−s].

Ejemplo 11.2. Dispersión de proteínas. Se desarrolla una electroforesis a 25 °C de muestras de ovalbúmina (PM = 45,000 Da), ImG (PM = 150,000 Da) y colágeno (PM = 345,000 Da), en un medio cuya viscosidad es de 0.001 kg/m−s.
Se pide estimar:
a) La variación de la dispersión por difusión con el tiempo de cada banda.
b) El tiempo de doblado del ancho original de la banda de muestra que es de 0.08 cm.
Solución:
a) Mediante las ecuaciones (11.22) y (11.23) se puede calcular la dispersión. En la Tabla 11.1 se presentan los resultados de los cálculos de difusividades de acuerdo a la ecuación (11.23).

Tabla 11.1: Cálculo de difusividades de proteínas. Ejemplo 11.2.

Proteína	PM	Difusividad (cm^2/s)
Ovalbúmina	45,000	7.88×10^{-7}
ImG	150,000	5.27×10^{-7}
Colágeno	345,000	3.99×10^{-7}

En la Figura 11.6 se presentan los resultados de los cálculos de la dispersión en función del tiempo. Se puede puntualizar que conforme aumenta el tamaño de la proteína, el coeficiente de dispersión disminuye y la dispersión es menor.
b) De acuerdo a los resultados anteriores la banda de ImG tardará alrededor de 1.8 h para doblar el ancho inicial. Mientras que la banda de ovalbúmina tarda 1.0 h aproximadamente.
Una forma de disminuir el grado de dispersión en una operación por lotes consiste en disminuir el tiempo de operación.

Electroósmosis

Otra causa de dispersión en una operación electroforética es la electroósmosis (Ahmadzadeh *et al.*, 2008). Ésta es el resultado del movimiento convectivo de iones de la capa difusa que se forma cuando una superficie sólida con carga

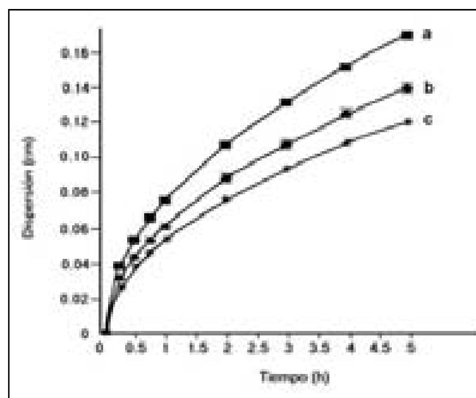


Figura 11.6: Dispersión de proteínas por difusión en electroforesis del Ejemplo 11.2. a) Ovalbúmina, b) ImG y c) Colágeno.

fija se somete a un campo eléctrico. Conforme los iones se mueven, imparten momentum al solvente y aceleran el fluido adyacente a la capa de Stern. Ésto se traduce en el desplazamiento neto de solvente hacia uno de los polos llamado flujo electroosmótico. Dado que la doble capa tiene una carga neta igual y de signo opuesto a la de la partícula sólida, el flujo electroosmótico se presenta en dirección opuesta al movimiento electroforético. Este efecto microscópico puede alterar el patrón de flujo macroscópico dependiendo de la configuración de la celda electroforética, alterando el desplazamiento de la muestra.

Ejemplo 11.3. Electroósmosis en un tubo capilar. El estudio de la dispersión por electroósmosis en microcanales es de gran importancia en el análisis de fluidos a microescala o en tecnologías de laboratorios en un chip (lab on a chip).

En el análisis, se considera una solución salina que fluye dentro de un capilar de longitud infinita, de tal manera que se desprecian los efectos a la entrada y salida del capilar. La pared interna del capilar está cargada negativamente y el capilar se somete a un campo eléctrico paralelo al eje de simetría del tubo. En estado estacionario la variación del potencial con el radio del capilar está dado por:

$$\frac{d^2\Phi}{dr^{*2}} + \frac{1}{r^*}\frac{d\Phi}{dr^*} = \frac{1}{\lambda^2}\text{Senh}\,(\Phi) \tag{A}$$

con la condición de frontera de simetría,

$$\text{en} \quad r^* = 0 \quad \frac{d\Phi}{dr^*} = 0 \tag{B}$$

y de la superficie del tubo,

$$\text{en} \quad r^* = 1 \quad \Phi = \zeta^* \tag{C}$$

donde $r^* = r/R_t$; $\lambda = \lambda_D/R_t$; $\Phi = z\mathcal{F}\phi/RT$; $\zeta^* = z\mathcal{F}\zeta/RT$ son las variables adimensionales correspondientes al radio del tubo, la longitud de Debye, el potencial y el potencial Z.

Se pide: Graficar la variación del potencial con el radio del capilar para valores de λ de $[0.01, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2$ y $10]$ utilizando un potencial Z de $\zeta^* = 2.79$.

Solución: En la Figura 11.7 (a-c) se presenta el programa MATLAB para la solución de la ecuación (A). Los perfiles de potencial se muestran en la Figura 11.7d. Puede apreciarse en la figura que conforme disminuye la longitud de Debye el gradiente de potencial se hace más pronunciado. Consecuentemente, la influencia del potencial Z sobre los iones de la solución comprende una distancia menor o menor longitud de apantallamiento.

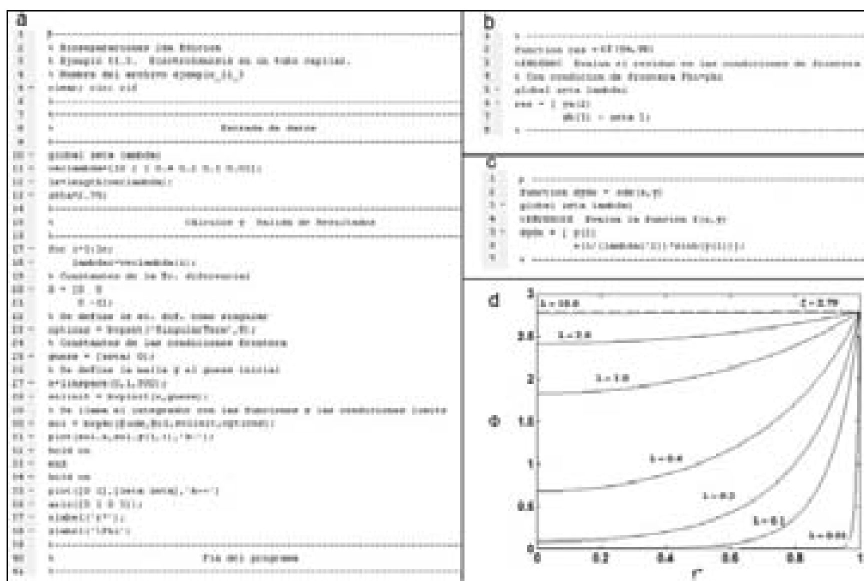


Figura 11.7: Ejemplo 11.3. a) Programa principal, b) Función de condiciones frontera, c) Función de la ecuación diferencial ordinaria y d) Perfil del potencial.

Efectos iónicos regulatorios

La diferencia de movilidad entre el soluto de interés y los iones del buffer donde se efectúa la electroforesis, puede generar dispersión durante la electroforesis. Para atenuar este efecto en la interfase delantera la muestra debe presentar una menor movilidad que el buffer, mientras que en la posterior es conveniente que la movilidad de la muestra sea mayor.

Gradientes de conductividad

Si la conductividad de la muestra es mayor que la del buffer, cuando el campo se incrementa arriba de un valor crítico, puede provocarse una distorsión en "forma de puntas" de la interfase. El buffer puede presentar una menor conductividad que la muestra por efecto de los iones que contiene.

Sobrecalentamiento: Efectos térmicos

Cuando una corriente eléctrica se hace pasar a través de un medio con una determinada resistencia parte de la energía se convierte en calor, fenómeno conocido como Efecto de Joule. En una operación electroforética el calor generado es proporcional al cuadrado del campo aplicado y al cuadrado del espesor del gel, de tal manera que la cantidad de muestra está limitada por este espesor.

La existencia de gradientes térmicos puede desnaturalizar solutos lábiles, dañar el gel o estimular la evaporación de solvente.

Sobrecalentamiento: Efecto de convección libre

Si la electroforesis se desarrolla en un medio líquido en ausencia del gel de soporte, los gradientes de temperatura pueden originar movimientos convectivos libres debido a la acción de la gravedad sobre los gradientes de densidad que se originan. Esta es la principal causa de mezclado en electroforesis. El grado de convección se caracteriza por el número adimensional de Rayleigh, Ra, el cual está dado por:

$$Ra = \frac{l^4 g}{\mu \alpha} \left(\frac{\Delta \rho}{\Delta z} \right) \tag{11.24}$$

donde:

l: Longitud característica de la geometría del aparato de electroforesis (en una celda es el espesor del gel). $[L]$.

g: Aceleración de la gravedad. $[L/t^2]$.

μ: Viscosidad del medio. $[M/L-t]$.

α: Difusividad térmica del medio. $[L^2/t]$.

$\Delta\rho/\Delta z$: Gradiente de densidad en la dirección z. $[M/L^4]$.

Entre menor sea el valor del Ra, menor es el efecto de la convección natural. De acuerdo con la ecuación (11.24) ésto se puede lograr de varias formas. La más empleada a nivel laboratorio es incrementar de la viscosidad mediante el uso de geles de soporte.

En equipos industriales que operan en forma continua se utilizan membranas porosas para separar regiones de electroforesis de diferente pH. Esto tiende a disminuir la convección al disminuir la longitud característica l.

11.2.4. Medios y Modos de la Electroforesis

La electroforesis ha evolucionado en forma considerable a partir de los trabajos pioneros de Arne Tiselius en 1937 y el desarrollo de la teoría de los electrolitos fuertes de Debye y Hückel en 1923. Actualmente existen diferentes medios y formas para efectuar una separación electroforética (Ivory, 1990).

Medios anticonvectivos

Se han utilizado diferentes medios para realizar las operaciones electroforéticas (Lehninger, 2005). Inicialmente se realizaban en medio líquido en celdas especiales . En 1939 fueron introducidos los primeros materiales anticonvectivos como papel filtro, fibra de vidrio y almidón granulado.

A mediados de los cuarenta se inició el uso de geles cuyo comportamiento es superior a los materiales anteriores por su menor tamaño de poro y menor carga superficial. A partir de 1959 fueron introducidos los geles de poliacrilamida (PAG de sus siglas en inglés) y de agarosa.

Los geles de agarosa tienen una estructura porosa altamente hidratada con poca carga que asemeja un medio líquido. Este tipo de gel es muy utilizado en análisis de ácidos nucléicos. Los geles de poliacrilamida están formados de polímeros más entrecruzados que producen poros más pequeños. Este gel es muy empleado en el análisis electroforético de proteínas, técnica conocida como PAGE (de las siglas en inglés de electroforesis en gel de poliacrilamida).

Una variante de la técnica PAGE es la PAGE-SDS. En ésta se agrega dodecil sulfato de sodio a la solución amortiguadora que provoca la desnaturalización de las proteínas. Las cadenas desnaturalizadas migran a una velocidad proporcional al logaritmo de su peso molecular PM,

$$\log(PM) = A - B\ m$$

donde A y B son constantes y m es la movilidad.

Modos de la electroforesis

En un proceso electroforético la velocidad de migración de las especies, depende tanto de su carga, tamaño y forma, como de las propiedades del medio. La resolución que se puede lograr considerando sólo estos parámetros ha sido mejorada imponiendo a los sistemas restricciones adicionales como el uso de geles porosos que incrementan la separación por filtración o la utilización de gradientes de pH que orientan a las especies de acuerdo a su punto isoeléctrico. Este tipo de modificaciones ha dado origen a una amplia gama de técnicas electroforéticas analíticas y preparativas, cuya clasificación es difícil, pero que en términos generales se pueden dividir en (Bier *et al.*, 1983; Varennea y Descroixb, 2008): a) electroforesis de interfase móvil (MBE), b) electroforesis de zona (ZE), c) electroforesis capilar, d) isotacoforesis (ITP) y e) enfoque isoeléctrico (IEF).

Electroforesis de interfase móvil La electroforesis de interfase móvil o electroforesis libre fue desarrollada por Arne Tiselius en 1937, logrando por primera vez resolver las globulinas sanguíneas en los tipos α, β y γ. Esta técnica utiliza una celda en forma de tubo en U (Fig. 11.8). Inicialmente se coloca dentro de la celda la solución que contiene la mezcla proteica en el buffer adecuado, posteriormente se añade una columna de solución con buffer. Al aplicarse el campo eléctrico cada proteína migra, de la muestra a la zona de buffer, formando una interfase. Cada banda se detecta en función de la velocidad de migración de la proteína particular, utilizando el índice de refracción. La proteína más rápida se coloca al inicio del patrón de migración en el brazo ascendente y la más lenta al final del brazo descendente de la celda.

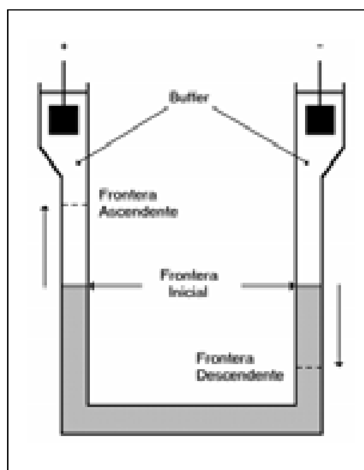


Figura 11.8: Representación esquemática de la celda de Tieselius. Electroforesis de interfase móvil.

La separación completa de los componentes de la mezcla no puede ser alcanzada mediante este tipo de electroforesis, sólo el soluto más rápido puede obtenerse en forma pura.

En los desarrollos recientes la electroforesis de interfase móvil actúa como una celda donde la banda de muestra aplicada es seminfinita, de tal manera que sólo pueden separarse solutos de igual carga. La colocación de la muestra depende del polo hacia el que va a migrar. Para solutos con carga positiva deberá colocarse en el ánodo. El resto de la celda se carga con electrolito rápido que permanezca siempre al frente de la migración y permita disminuir la dispersión de la muestra (Fig. 11.9).

Electroforesis de zona: de campo unidireccional y de campo pulsante En la electroforesis de zona descrita al inicio de la sección 11.2, la muestra es pequeña y diluida, entonces es posible lograr su resolución completa mediante

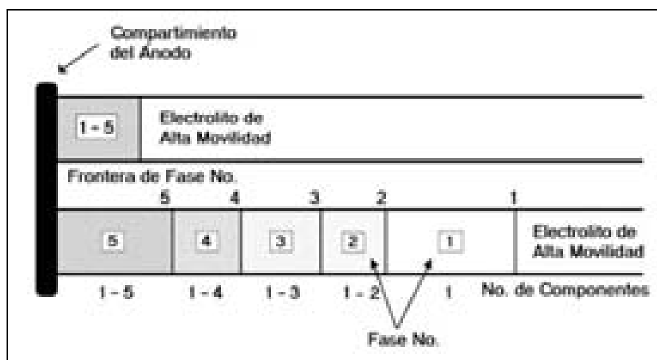


Figura 11.9: Electroforesis de interfase móvil de cinco componentes iónicos. (antes y después). Tomada de: Ivory, 1990. Reproducida con el permiso de Marcel Dekker Inc. Copyright ©1990. Todos los derechos reservados.

la aplicación de un campo unidireccional. Este tipo de electroforesis puede ser empleada para resolver mezclas de cargas diferentes.

Una variante de la electroforesis de zona consiste en utilizar geles de agarosa y un campo que cambia de dirección periódicamente (típicamente $90° - 120°$), llamado campo pulsante. Esta operación es muy utilizada para la separación de DNA de alto peso molecular, entre 20 kb y 12 Mbp (Maule, 1998). En forma simplificada, se puede establecer que las moléculas de DNA de gran tamaño pueden migrar a través de los poros de agarosa zigzagueando (evitando los poros chicos) por la acción de los pulsos de campo. Si los pulsos son de corta duración, los cambios de la dirección del campo son rápidos y permiten que las moléculas más pequeñas migren, mientras que las más grandes no pueden responder rápidamente y permanecen atrapadas en la matriz. Conforme la duración de los pulsos aumenta, las moléculas grandes son más capaces de migrar, pero la resolución de las más pequeñas es menor. La separación está influenciada por la duración de los pulsos.

Electroforesis capilar La electroforesis capilar (CE) es un método atractivo desde el punto de vista analítico debido a que se requieren muestras muy pequeñas, se consume poco buffer, el tiempo de análisis es corto y es más fácil de operar y automatizar que la electroforesis clásica en gel. Esta técnica también es muy versátil y puede ser aplicada a la separación de diferentes tipos de solutos debido a los diferentes modos en que puede ser operada (como los descritos en las otras secciones).

Mientras que en la electroforesis clásica se utilizan geles para evitar la convección y perturbaciones mecánicas, en la CE no se requiere necesariamente el uso de tales geles. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco (existen arreglos de varios tubos o fibras) de diámetro muy pequeño típicamente 100 μm, de ahí que reciba el nombre de capilar. Dentro de este capilar se encuentran la

disolución que contiene los analitos o las moléculas a separar y el buffer o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente. El electrolito controla el pH y la fuerza iónica del medio donde se realiza la separación. La separación se basa en el tamaño, la forma y la carga de los solutos a separar. Debido a su alta relación de área a volumen la disipación de calor es más fácil.

Bajo la acción del campo eléctrico, los iones migran a través del tubo con diferentes velocidades y alcanzan el punto de detección en diferentes tiempos. De esta manera, los perfiles de concentración pueden ser detectados y graficados en forma de electroferogramas de los picos de los solutos.

Isotacoforesis En una separación por isotacoforesis la muestra se inserta entre un electrolito rápido y uno lento (Fig. 11.10), formando una banda finita. En estado estacionario todos los constituyentes se mueven a la misma velocidad, en un orden impuesto por sus movilidades, con la ventaja de que cada banda contiene sólo un tipo de electrolito (el ancho de la banda es una medida de la concentración de la especie en la muestra original).

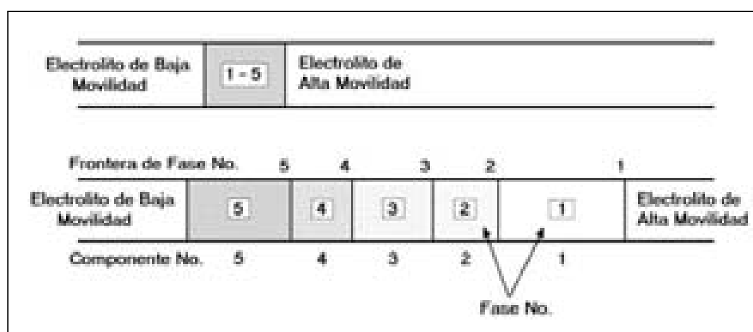


Figura 11.10: Isotacoforesis de cinco especies iónicas (antes y después). Tomada de: Ivory, 1990.

Enfoque isoeléctrico Cuando la separación electroforética es por medio de enfoque isoeléctrico (IEF) se requiere un gradiente de pH en el medio donde se realiza la electroforesis (Fig. 11.11). En el medio continuo de pH las moléculas como las proteínas se ordenan conforme a su punto isoeléctrico, es decir al migrar llegan a un punto donde su carga neta es cero y por lo tanto su movilidad es nula (la figura sólo muestra la carga neta de la partícula).

El enfoque isoeléctrico es una operación gobernada por el equilibrio, mientras que las otras operaciones son controladas por la velocidad de transporte.

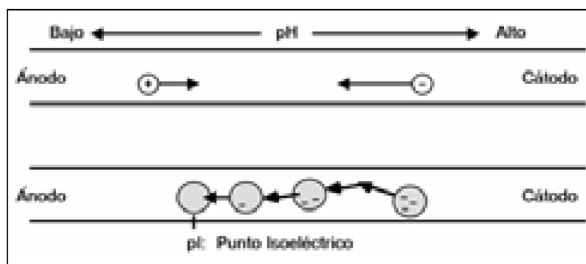


Figura 11.11: Enfoque isoeléctrico de solutos polianfolíticos (antes y después). Tomada de: Ivory, 1990.

11.3. Equipos de Electroforesis

Actualmente existe un buen número de equipos de electroforesis a escala preparativa, en la Tabla 11.2 se presentan las principales características de algunos de ellos.

A nivel laboratorio y en algunos equipos a escala preparativa, la forma que se ha empleado para minimizar el problema de la dispersión de la muestra por convección, ha sido el uso de geles como medios de soporte. Estas técnicas han sido caracterizadas como tediosas y costosas, debido que al finalizar la operación se requiere recortar las regiones de gel donde se localizan las bandas y extraer por electroelución o algún otro método los solutos de interés.

Para evitar el uso de geles se han diseñado equipos donde la electroforesis se realiza en medios líquidos, y donde la longitud característica l del número de Rayleigh se reduce empleando películas delgadas o mediante el uso de membranas. Otro tipo de equipos combina la electroforesis con la cromatografía para eficientar las separaciones.

De manera general los diversos equipos de electroforesis existentes se pueden dividir en tres tipos:

- Equipos de flujo libre.
- Equipos de flujo libre con recirculación.
- Equipos electrocromatográficos.

11.3.1. Equipos de Flujo Libre

En los equipos de flujo libre a diferencia de los equipos que presentan recirculación, el medio no se recircula. La estabilización de los flujos se logra empleando distancias pequeñas de migración o estabilización rotacional. Los principios de los diferentes modos de electroforesis de flujo libre también han sido aplicados

Tabla 11.2: Características de algunos equipos de electroforesis.

Tipo	Película con flujo libre	Película con flujo libre	Tipo tambor	Película con recirc.
1.Compañía	Bender y Hobein	Hirschmann	Bio-Rad	Protein Techs
2.Nombre	Elphor VaP 22	ACE 710	Rotofor Prep IEF	RF3
3.Introducción	1987	1986	1987	1990
4.Precio dls.	80,000	140,000	7,000	30,000
5.Técnicas				
Electroenfoque	Sí	Sí		Sí
SDS-PAGE	No	No	No	No
PAGE	No	No	No	No
Agarosa	No	No	No	No
Geles	No	No	No	No
Isotacoforesis	Sí	No	Sí	
Zona	Sí	Sí	No	No
Escalón de campo	Sí	No	No	No
6.Operación	Continua	Continua	Intermitente	Intermitente
7.Estabilización del flujo				
Rotación	No	No	Sí	No
Membranas	No	No	Sí	Sí
Película	Si	Si	No	Sí
Gel	No	No	No	No
8.Dimensión de la celda				
Geometría	Rectangular	Rectangular	Anular	Rectangular
Sección transversal	250 mm^2	60 mm^2	627 mm^2	150 mm^2
Longitud de separación	10 cm	4 cm	12.5 cm	4 cm
9.Campo Típico	100-300 V/cm	100-150 V/cm	50-100 V/cm	250-375 V/cm
10.Tiempo de operación típico	Continuo	Continuo	3-5 h	2 h
11.Tamaño típico de la muestra	25×10^6 cel/ml	5×10^6 cel/ml	100 μg $-$1 g	mg-g proteína
12. Producción típica	500×10^6 cel/h	100×10^6 cel/h	0.2-500 mg/día	5-500 mg/corr.
13. Enfriamiento	Sí	Sí	Si	Sí
14. Detector	UV/Vis, Variable	UV/Vis Var.	No	No
15. Colector de fracciones	Sí	Sí	Si	Sí
Número de fracciones	90	35	20	30
Proceso de colección	Lento	Rápido	Rápido	Rápido

Adaptada de: Eby, 1991.

en la construcción de dispositivos de microflujo que pueden ser utilizados en separaciones y monitoreo en tiempo real (Kohlheyer *et al.*, 2008).

Existen dos arreglos básicos de los equipos de flujo libre: a) tipo película delgada y b) tipo anular.

Película delgada

Los equipos de electroforesis de película delgada han sido estudiados desde los años cincuenta (Hamel y Hunter, 1990). En tales sistemas se inyecta una corriente continua y puntual de muestra sobre una película de buffer que se mueve verticalmente en flujo laminar entre dos placas (Fig. 11.12). En las partes laterales de este arreglo se sitúan los electrodos en forma de placas. La muestra emigra horizontalmente conforme pasa por la cámara. Los solutos forman bandas discretas de acuerdo a sus movilidades electroforéticas, y son eluidos continuamente por el fondo de la cámara y colectados por medio de una bomba de canal múltiple. El calor generado es removido por medio de refrigerantes que enfrían las paredes laterales.

Uno de los usos principales de este tipo de equipos es en la separación de células, virus, partículas subcelulares y componentes de membrana.

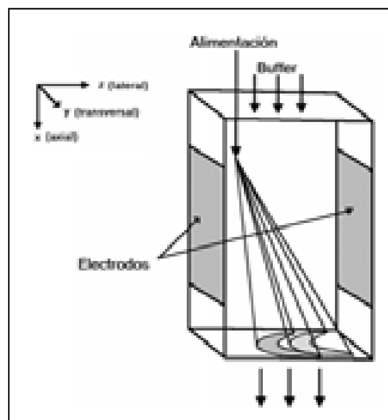


Figura 11.12: Esquema de un equipo de electroforesis de flujo continuo en una celda de electroforesis. Tomada de: Gobie y Ivory, 1986. Reproducida con el permiso de la American Chemical Society. Copyright ©1986. Todos los derechos reservados.

Electroforesis anular

La electroforesis de flujo libre también se ha conducido en arreglos anulares basados en el diseño de Philpot-Harwell (Fig. 11.13). En estos sistemas el cilindro interno es fijo y funciona como cátodo, mientras que el exterior gira a velocidades hasta de 150 rpm. Este movimiento permite neutralizar los efectos convectivos radiales. La muestra y el buffer son inyectados en la base del anillo y se mueven axialmente hacia el colector múltiple situado en la parte superior.

11.3.2. Equipos de Flujo Libre con Recirculación

En los equipos de flujo libre con recirculación el medio líquido donde se efectúa la electroforesis se recircula continuamente. Existen diferentes tipos de arreglos para estos equipos como: a) celda tipo tambor, b) película delgada con recirculación y c) película delgada con recirculación desplazada.

Celda tipo tambor

La celda tipo tambor (Fig. 11.14) consta de una cámara cilíndrica que gira a 1.0 rpm, dividida en 20 compartimientos por medio de 19 discos de membranas de poliéster con poros de 10 μm.

Este tipo de equipo es operado con gradientes de pH, de tal manera que la operación es conocida como enfoque isoeléctrico con recirculación (RIEF de sus siglas en inglés). La rotación de la cámara y las membranas permiten enfocar

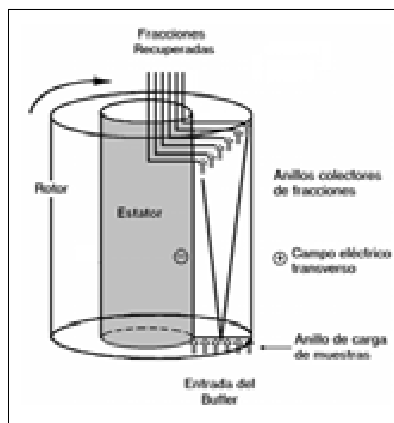


Figura 11.13: Esquema de un equipo de flujo libre en un arreglo anular. Tomada de: Hamel y Hunter, 1990. Reproducida con el permiso de la American Chemical Society.

apropiadamente las zonas. Cada cámara posee una posición para alimentar la muestra y una para descargarla, lo cual se efectúa por medio de vacío.

El campo eléctrico se provee por medio de dos electrodos situados en los extremos de la cámara. El enfriamiento se realiza por medio de un tubo de cerámica por el cual fluye el líquido de enfriamiento por el interior del tambor.

Película delgada con recirculación

Una variante de los equipos de enfoque isoeléctrico con recirculación (RIEF), es la celda de película delgada con recirculación que separa físicamente las funciones de enfriamiento y estabilización del fluido (Fig. 11.15). En este arreglo la solución que va a fraccionarse es recirculada continuamente entre la celda de canales múltiples donde se realiza la electroforesis y un intercambiador de calor de canales múltiples. El flujo en la celda es laminar ya que está dividida por membranas formando canales de flujo muy delgados. La operación se efectúa utilizando un gradiente de pH sobre la cámara y sólo el 6 % de la muestra permanece en la cámara en un tiempo dado. Típicamente una separación se realiza después de cientos de ciclos en aproximadamente dos horas.

Película delgada con recirculación desplazada

Una variante del arreglo físico anterior empleado en electroforesis de zona (Fig. 11.16), es la electroforesis en película delgada con recirculación desplazada. En este sistema la muestra es inyectada continuamente en un canal de la celda y reinyectada en forma desplazada, de tal manera que su migración neta es alterada. Los solutos más lentos tenderán a migrar en el sentido del desplazamiento de la alimentación, cuando este desplazamiento sea lo suficientemente

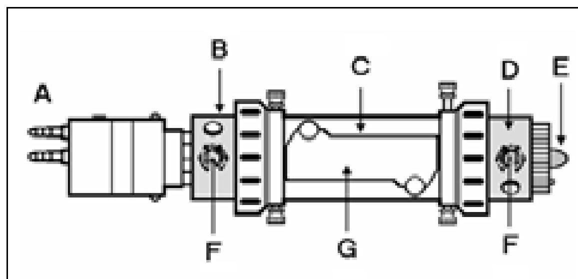


Figura 11.14: Celda de electroforesis tipo tambor rotatorio. A) Entrada y salida de refrigerante, B) Ánodo, C) Cámara de electroenfoque, D) Cátodo, E) Brazo de enfriamiento, F) Venteo y G) Cubierta. BioRad.

grande; y en dirección contraria cuando el soluto tenga una movilidad tal que logre tener un desplazamiento mayor que el provocado por el movimiento de la recirculación.

11.3.3. Equipos Electrocromatográficos

Otra alternativa para disminuir los problemas convectivos en la electroforesis son los sistemas que utilizan medios con partículas como las usadas en cromatografía y se pueden mencionar dos tipos: a) equipos de electrocromatografía anular rotativa continua y b) equipos de electrocromatografía de efectos opuestos.

Electrocromatografía anular rotativa continua

En los equipos de electrocromatografía anular rotativa continua (CRAE de sus siglas en inglés) (Fig. 11.17), la muestra se alimenta en forma continua en un punto de un lecho anular y se eluye mientras el lecho rota. El campo es aplicado axialmente.

Electrocromatografía de efectos opuestos

En la electroforesis cromatográfica de efectos opuestos (CACE de sus siglas en inglés), el campo eléctrico es antiparalelo al movimiento convectivo forzado, y se desarrolla en una columna empacada de cromatografía por exclusión, que presenta dos secciones de diferente resolución (Fig. 11.18). La parte superior de la columna se empaca con gel excluyente del soluto de interés y la parte inferior con gel incluyente, de tal manera que éste se mueva más rápidamente en la parte superior. Con un manejo adecuado de la intensidad del campo, el soluto de interés puede tener un movimiento neto siempre hacia el centro de la columna y acumularse en esa región, mientras que los contaminantes salen por alguno de los extremos. Este arreglo produce separaciones de alta pureza

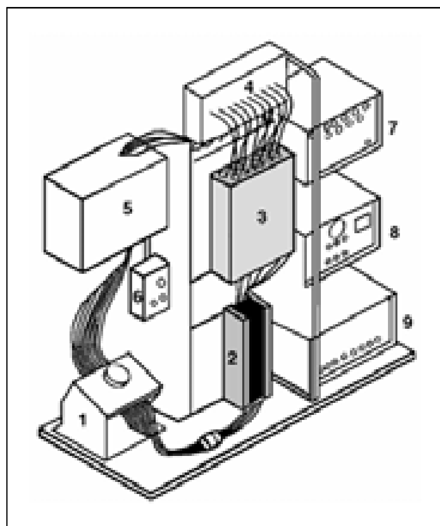


Figura 11.15: Esquema de un equipo electroforético con recirculación. 1) Bomba, 2) Celda de enfoque, 3) Intercambiador, 4) Monitor de pH, 5) Monitor UV, 6) Control de la bomba, 7) Interfase de datos, 8) Centro de carga y 9) Control UV. Adaptado de: Bier, 1986.

y concentración, pero su productividad está limitada por el calentamiento y la caída de presión.

11.4. Diseño de Equipo de Electroforesis

El tratamiento de la electroforesis al igual que las columnas cromatográficas puede ser abordado empleando:

- La teoría de platos.
- La teoría cinética.

11.4.1. Teoría de Platos

La teoría de platos es útil para comparar el comportamiento de un mismo equipo con diferentes aplicaciones, así como comparar la misma aplicación con equipos diferentes. Como se estableció anteriormente la desviación estándar en equipos electroforéticos cuya principal causa de dispersión es la difusión molecular está dada por:

$$\sigma = (2Dt)^{\frac{1}{2}} \tag{11.25}$$

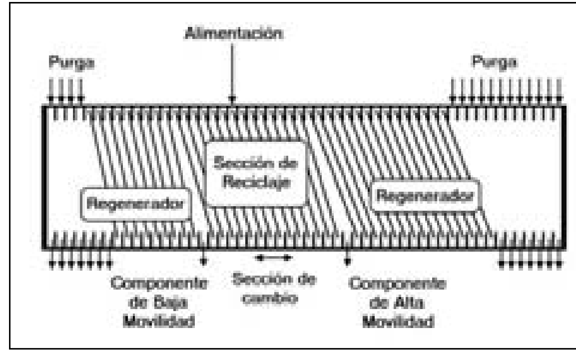


Figura 11.16: Esquema de un equipo electroforético de película delgada con recirculación desplazada. Tomada de: Ivory, 1990. Reproducida con el permiso de Marcel Dekker Inc. Copyright ©1990. Todos los derechos reservados.

donde:

D: Dispersión axial. $[L^2/t]$.

t: Tiempo. $[t]$.

σ: Desviación estándar. $[L]$.

La ecuación (11.25) se puede expresar en términos de parámetros electroforéticos introduciendo la expresión:

$$v = mE = m\left(\frac{V}{L}\right) \tag{11.26}$$

donde:

v: Velocidad del soluto. $[L/t]$.

m: Movilidad. $[L^2/\text{V}-t]$.

E: Campo. $[\text{V}/L]$.

V: Voltaje. $[\text{V}]$.

L: Longitud de la celda. $[L]$

El tiempo puede expresarse como:

$$t = \frac{L}{v} \tag{11.27}$$

entonces se combinan las ecuaciones (11.25), (11.26) y (11.27) para obtener:

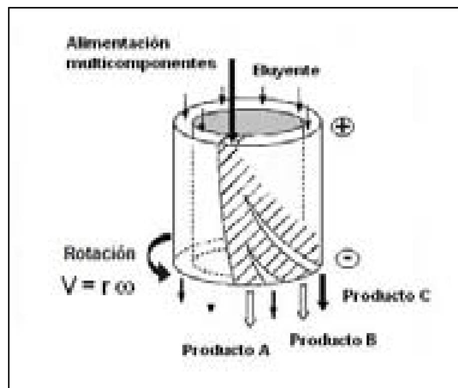


Figura 11.17: Esquema de un equipo de electrocromatografía anular rotativa continua. Tomada de: Hamel y Hunter, 1990. Reproducida con el permiso de la American Chemical Society. Copyright ©1990. Todos los derechos reservados.

$$\sigma = \left(\frac{2DL^2}{mV}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{11.28}$$

De acuerdo a la teoría de platos, la eficiencia de la separación puede definirse como la dispersión por unidad de longitud,

$$HETP = \frac{\sigma^2}{L} \tag{11.29}$$

Las ecuaciones (11.28) y (11.29) conducen a:

$$HETP = \frac{2DL}{mV} \tag{11.30}$$

como:

$$L = (HETP)(N) \tag{11.31}$$

entonces

$$N = \frac{mV}{2D} \tag{11.32}$$

De estos resultados es importante notar que N es independiente de L. Asimismo, N puede incrementarse aumentando V. Por otro lado, $HETP$ aumenta con L. Esto implica que las distancias cortas de migración son las más eficientes para la separación.

La resolución de dos componentes del sistema cuando su coeficiente de dispersión es el mismo está dado por (Rudge y Ladisch, 1986):

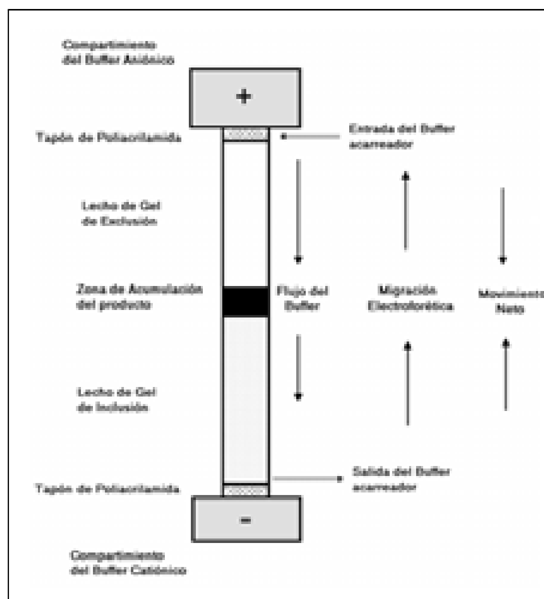


Figura 11.18: Electrocromatografía de efectos opuestos. Tomada de: Hamel y Hunter, 1990.

$$R_S = \frac{1}{4}\left(\frac{\overline{m}V}{2D}\right)^{\frac{1}{2}}\left(\frac{m_1 - m_2}{\overline{m}}\right) \tag{11.33}$$

donde m_1 y m_2 son las movilidades del soluto 1 y 2, respectivamente y:

$$\overline{m} = \frac{m_1 + m_2}{2}$$

De acuerdo a la expresión (11.33) el voltaje incrementa la resolución.

Ejemplo 11.4. Resolución de una mezcla de proteínas. Se desea separar dos enzimas mediante una electroforesis en gel a 4 °C. El coeficiente de dispersión axial es de 2×10^{-7} cm^2/s. La movilidad es de $m_1 = 3.38\times10^{-5}$ cm^2/V−s y $m_2 = 1.33 \times 10^{-5}$ cm^2/V−s, respectivamente. Para realizar la separación se utiliza una celda de 2.0 cm donde se aplica un campo de 1.8 V/cm por un lapso de 7.5 h.

Se pide estimar:

a) La distancia que viaja cada soluto.

b) La eficiencia de la separación de cada soluto.

c) La resolución de la separación.

Solución:
a) La distancia puede ser calculada mediante la expresión

$$L = vt = mEt$$

de tal manera que:

$$L_1 = 3.38 \times 10^{-5}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}} \times 1.8\ \frac{\text{V}}{\text{cm}} \times 7.5\ \text{h} \times \frac{3600\ \text{s}}{\text{h}} = 1.64\ \text{cm}$$

y,

$$L_2 = 1.33 \times 10^{-5}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{cm}} \times 1.8\ \frac{\text{V}}{\text{cm}} \times 7.5\ \text{h} \times \frac{3600\ \text{s}}{\text{h}} = 0.64\ \text{cm}$$

La separación entre los solutos es:

$$L_1 - L_2 = 1.0\ \text{cm}$$

b) De acuerdo a la ecuación (11.30),

$$\begin{aligned} HETP &= \frac{2D}{mE} \\ (HETP)_1 &= \frac{2\left(2 \times 10^{-7}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}\right)}{3.38 \times 10^{-5}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}} \times 1.8\ \frac{\text{V}}{\text{cm}}} = 6.57 \times 10^{-3}\ \text{cm} \\ (HETP)_2 &= \frac{2\left(2 \times 10^{-7}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}\right)}{1.33 \times 10^{-5}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}} \times 1.8\ \frac{\text{V}}{\text{cm}}} = 1.67 \times 10^{-2}\ \text{cm} \end{aligned}$$

c) Utilizando la ecuación (11.33) se puede calcular la resolución. Primero es necesario calcular la movilidad promedio,

$$\overline{m} = \frac{m_1 + m_2}{2} = \left(\frac{(3.38 + 1.33) \times 10^{-5}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}}}{2}\right) = 2.334 \times 10^{-5}\ \frac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}}$$

de tal manera que,

$$
\begin{aligned}
R_S &= \frac{1}{4}\left(\frac{2.334\times 10^{-5}\ \dfrac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}}\times 1.8\ \dfrac{\text{V}}{\text{cm}}\times 2\ \text{cm}}{2\times 2\times 10^{-7}\ \dfrac{\text{cm}^2}{\text{s}}}\right)^{\frac{1}{2}} \\
&\left[\frac{(3.38-1.33)\times 10^{-5}\ \dfrac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}}}{2.334\times 10^{-5}\ \dfrac{\text{cm}^2}{\text{V}-\text{s}}}\right] \\
R_S &= 3.18
\end{aligned}
$$

11.4.2. Teoría Cinética

En un proceso electroforético la velocidad de migración depende de la carga, tamaño y forma de la partícula de interés, así como de las propiedades del medio. La resolución puede ser incrementada mediante gradientes de pH, filtración molecular o modificaciones del flujo. Esto ha dado origen a una diversidad de procedimientos para optimizar las separaciones electroforéticas.

Actualmente se cuenta con un teoría unificada para tratar los diversos modos electroforéticos (ZE, MB, ITF e IEF) (Bier *et al.,* 1983), lo cual demuestra que las ecuaciones que rigen estos procesos son idénticas. Las diferencias aparentes surgen de las diferentes condiciones iniciales y de frontera de cada caso. A continuación se presentan algunos modelos particulares.

Película delgada con alimentación continua

En el caso de la electroforesis en película delgada con alimentación continua, el soluto está sujeto a fuerzas difusivas, convectivas y electroosmóticas, que determinan su patrón de elución. En estado estacionario y para un campo E constante, el balance de masa de soluto en este tipo de arreglos esta dado por:

$$
\upsilon_x(y)\frac{\partial c}{\partial x} + mE\frac{\partial c}{\partial z} + \upsilon_z(y)\frac{\partial c}{\partial z} = D\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + S_o(x) \tag{11.34}
$$

donde υ_x es la velocidad parabólica axial y υ_z es la velocidad osmótica lateral. $S_o(x)$ es un término que describe la distribución del flujo de soluto inyectado.

La ecuación (11.34) es una ecuación difusiva, convectiva tridimensional, cuya forma más sencilla es su solución asintótica (Gobie y Ivory, 1986).

Electrocromatografía

En el caso de electrocromatografía en columna si se supone que mE es independiente de la concentración, en ausencia de electroósmosis el modelo empleado es:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = v_x \frac{\partial c}{\partial x} + mE \frac{\partial c}{\partial x} - D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + R \qquad (11.35)$$

rearreglando,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = (v_x + mE) \frac{\partial c}{\partial x} - D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + R \qquad (11.36)$$

donde R es la acumulación de soluto en la fase sólida y v_x es la velocidad del flujo convectivo. Este resultado indica que las soluciones a la ecuación de diseño de las columnas cromatográficas, pueden ser aplicadas a la electrocromatografía, sustituyendo v_x por $(v_x + mE)$.

11.5. Sumario

La electroforesis es una operación que permite la purificación de solutos por la acción de un campo eléctrico.

Uno de los problemas que se presenta normalmente en las operaciones electroforéticas es la dispersión que sufre la muestra conforme la operación se desarrolla. Para abordar esta dificultad se han desarrollado diversas formas y medios para efectuar la operación, lo cual se ha traducido en una variedad de equipos disponibles a escala preparativa.

El diseño de los equipos de electroforesis se realiza mediante enfoques similares a los utilizados en cromatografía de columna, y actualmente su desarrollo es incipiente y basado fuertemente en las pruebas de laboratorio.

11.6. Problemas

11.1. Carga y pH. Se realiza una separación electroforética de zona con campo unidireccional a un de pH = 7.1, de una mezcla que contiene ácido glutámico (pI = 3.2), arginina (pI = 10.8) y valina (pI = 6.0).

Se pide definir el (o los) aminoácido que:
a) Migra hacia el cátodo.
b) Migra hacia el ánodo
c) Migra más rápido hacia el ánodo.

11.2. Movilidad relativa. La movilidad relativa de β-galactosidasa respecto a la de citocromo c en un gel de PAGE-SDS es de 0.2, mientras que la de actina es de 0.6. Los pesos moleculares de estas proteínas son de 130,000 para la β-galactosidasa y de 45,000 Da para la actina (Condeelis, 1977).

Se pide: Estimar la movilidad relativa de ASB (albúmina de suero de bovino) en el mismo gel si su peso molecular es de 68,000 Da.

Resp. 0.42.

11.3. Longitud de Debye. Calcular la longitud de Debye para una solución acuosa 0.1 M de NaCl a 37 °C. La constante dieléctrica del agua es $\varepsilon = 80\ \varepsilon_o$, donde $\varepsilon_o = 8.85 \times 10^{-12}$ F/m es la constante dieléctrica del vacío.

Resp. $\lambda_D = 9.9 \times 10^{-10}$ m $= 9.9$ $\mathring{A}$.

11.4. Número de platos. La electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) es una poderosa técnica analítica que maneja muestras menores de 1 μg (Frenz y Hancok, 1991).

Se pide: Estimar el número de platos de una columna de HPCE donde la movilidad del soluto es de 10^{-8} m^2/V$-$s, el voltaje aplicado es de 30 KV y el coeficiente de dispersión de 10^{-10} m^2/s.

Resp. 1.5×10^6 platos.

11.5. Tiempo de separación. Se desea separar dos proteínas en una celda electroforética aplicando un gradiente de potencial de 1.2 V/cm. Bajo las condiciones de la electroforesis la movilidad de las proteínas es de -1.2×10^{-4} y 2.1×10^{-4} cm^2/V$-$s, respectivamente.

Se pide: Estimar el tiempo de separación de estas proteínas si inicialmente se colocan formando una banda de 0.4 cm de espesor.

Resp. 0.51 h.

11.6. Movilidad de globulos rojos. La movilidad electroforética de las células de glóbulos rojos humanos es independiente de las razas, edad, sexo y varios otros factores. Esta propiedad permite tomar a este tipo de células como un patrón electroforético (Brinton y Lauffer, 1959).

Se pide: Estimar la movilidad de glóbulos rojos en un medio M/15 de fosfatos a pH = 7.4, si la viscosidad del medio puede tomarse como la del agua, el potencial Z es de 0.0168 V y la constante dieléctrica es de 9.8×10^{-9} C^2/N$-$m^2.

Resp. 1.31 μm$-$cm/V$-$s.

11.7. Bibliografía

Ahmadzadeh, H.; Prescott, M.; Muster, N.; Stoyanov, A. **2008**. Revisiting electroosmotic flow: An important parameter affecting separation in capillary and microchip electrophoresis. *Chem. Eng. Comm.* 195, 129-146.

Bier, M. **1986**. Scale-Up isoelectric focusing. En: *Separation, Recovery and Purification in Biotechnology.* Asenjo J.A.; Hong, J. (Eds). ACS Symposium Series 314. ACS. Washington, D.C. 13, 185-192.

Bier, M.; Palusinski, O.A.; Mosher, R.A.; Saville, D.A. **1983**. Electrophoresis: Mathematical modeling and computer simulation. *Science.* 219, 1281-1286.

Bird, R.B.; Stewart, W.E.; Lightfoot, E.N. 2002. *Transport Phenomena.* John Wiley and Sons. New, York. 2da Edición. p. 61.

Brinton, C.C.; Lauffer, M.A. **1959**. The electrophoresis of virues, bacteria, and cells, and the microscope methods of electrophoresis. En: *Electrophoresis: Theory, Methods, and Applications.* Bier, M. (Ed.). Academic Press. New York. 10, 427-492.

Castellan, G.W. **1971**. *Fisicoquímica.* Fondo Educativo Interamericano. México. 18, 430-431.

Condeelis, J.S. **1977**. A sodium dodecil sulfate microgel-electrophoresis technique suitable for routine laboratory analysis. *Anal. Biochem.* 77, 195-207.

Eby, M.J. **1991**. Prep-phoresis: A wealth of novel possibilities. *Bio/Tech.* 9, 528-530.

Frenz, J.; Hancok., W.S. **1991**. High performance capillary electrophoresis. *Tibtech.* 9, 243-250.

Gobie, W.A.; Ivory, C.F. **1986**. High-resolution, high-yield continuous-flow electrophoresis. En: *Separation, Recovery and Purification in Biotechnology.* Asenjo J.A.; Hong, J. (Eds). ACS Symposium Series 314. ACS. Washington, D.C. 12, 169-184.

Hamel, J.P.; Hunter, J.B. **1990**. Modeling and applications of downstream processing. En: *Downstream Processing and Bioseparations.* Hamel, J.P., Hunter, J.B.; Skidar, S.K. (Eds.). ACS Symposium Series 419. ACS. Washington, D.C. 1, 1-35.

Horstmann, B.J.; Chase, H.A. **1989**. Modelling the affinity adsorption of inmunoglobulin G to protein A inmobilised to agarose matrices. *Chem. Eng. Res. Des.* 67, 243-254.

Ivory, C.F. **1990**. Electrically driven separation processes: Analytical and preparative methods. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 16, 517-567.

Kohlheyer, D.; Eijkel, J.C.T.; Berg, A.; Schasfoort, R.B.M. **2008**. Miniaturizing free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*. 29, 977-993.

Maule, J. **1998**. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Molec. Biotechnol.* 9, 107-126.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. **2005**. Lehninger: *Principios de bioquímica*. Cuarta Edición. Ed. Omega. 92-93.

Rudge, S.R.; Ladisch, M.R. **1986**. Process considerations for scale-up of liquid chromatography and electrophoresis. En: *Separation, Recovery and Purification in Biotechnology*. Asenjo J.A.; Hong, J. (Eds.). ACS Symposium Series 314. ACS Washington, D.C. 10, 122-152.

Varennea, A.; Descroix, S. **2008**. Recent strategies to improve resolution in capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta*. 628, 9-23.

Parte V

Operaciones de Acabado

Las operaciones finales de un proceso de bioseparación son las de acabado del producto. Estas operaciones permiten incrementar la pureza del producto, facilitar su manejo y mejorar su apariencia. En esta Parte V del libro se revisan dos de las operaciones de acabado más utilizadas en los procesos biotecnológicos.

En el Capítulo 12, se trata la operación de cristalización que es muy empleada tanto en la obtención de productos biotecnológicos tradicionales como los antibióticos, como en la obtención de productos provenientes de la tecnología del r-DNA como las proteínas terapéuticas.

En el Capítulo 13 se presenta la operación de secado, la cual se utiliza como fase terminal de los procesos de cristalización, o bien para el secado de caldos en la producción masiva de algunos productos.

Capítulo 12

Cristalización

12.1. Introducción

La operación de cristalización consiste en separar un soluto de una solución mediante la formación de cristales. Una vez formados, los cristales se separan de la solución obteniéndose el soluto con un alto grado de pureza.

Durante el proceso de cristalización los cristales deben formarse primero y luego crecer. Al fenómeno de formación de pequeños cristales se le llama nucleación y a la formación capa por capa del cristal se le llama crecimiento.

La sobresaturación es la fuerza impulsora tanto de la nucleación como del crecimiento de los cristales. Si la solución sólo está saturada, los cristales no se transforman ni crecen, mientras que si está subsaturada éstos tienden a disolverse.

La cristalización es muy utilizada a nivel industrial para recuperar sales como cloruro de sodio y sulfato de amonio a partir de soluciones acuosas. Algunas sustancias orgánicas como la sacarosa y la glucosa también son obtenidas mediante procesos que involucran una operación de cristalización.

Varios productos biotecnológicos de uso masivo como algunos antibióticos y ácidos orgánicos, así como algunos productos terapéuticos, son comercializados en forma de cristales. Esta diversidad de procesos se traduce en una gran variabilidad en la capacidad de los cristalizadores industriales que oscila de gramos a cientos de toneladas por día.

La cristalización es una operación ampliamente utilizada en los procesos biotecnológicos debido a que ofrece entre otras, las siguientes ventajas: a) se puede obtener en una sola etapa un producto de una pureza de hasta un 99 %, b) se puede controlar la operación de tal manera que se produzcan cristales uniformes que faciliten su manejo, empaque, almacenamiento, c) mejora la presentación o apariencia del producto para su comercialización y d) es una operación que puede llevarse a cabo a temperaturas moderadas. En el caso de proteínas terapéuticas, su forma cristalizada puede ofrecer ventajas en su administración (Hekmat *et al.*, 2008).

Frecuentemente la operación de cristalización va acompañada de un lavado de los cristales en un equipo de separación sólido-líquido y de un secado final, en un sistema como el mostrado en la Figura 12.1.

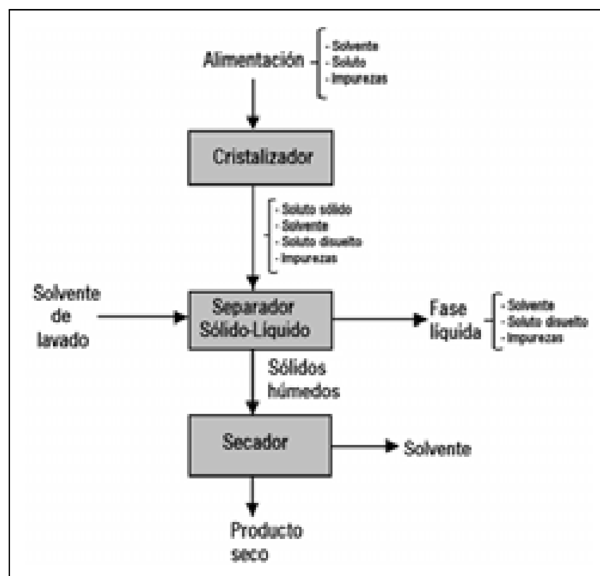


Figura 12.1: Esquema de un sistema de cristalización. Adaptada de: Moyers y Rousseau, 1987.

El diseño apropiado del cristalizador es esencial en el funcionamiento de todo el arreglo anterior debido a que el tamaño y concentración de los cristales en la solución de salida, son determinados en gran medida en la operación de cristalización; a su vez estos parámetros determinan el diseño del separador sólido-líquido y del secador (Bakar *et al.*, 2009).

La cristalización es en gran medida un arte más que una ciencia; sin embargo, el conocimiento actual de los mecanismos de formación y crecimiento de los cristales, y de la fuerza impulsora de éstos, la sobresaturación, permite abordar el crecimiento de cristales de una manera más científica.

La estrategia para el diseño de cristalizadores comprende el establecimiento de las relaciones de equilibrio, la forma de operar del cristalizador (el método para generar la sobresaturación) y el tipo de cristalizador que se va a emplear. Una vez obtenido el diseño conceptual del cristalizador, el problema de diseño restante consiste en determinar el diseño funcional que permita satisfacer los requerimientos de tamaño de cristal mediante el estudio cinético del sistema (Fig. 12.2).

Para abordar los aspectos relacionados con la cristalización, en la sección 12.2 de este capítulo se revisan los fundamentos de la operación: el equilibrio,

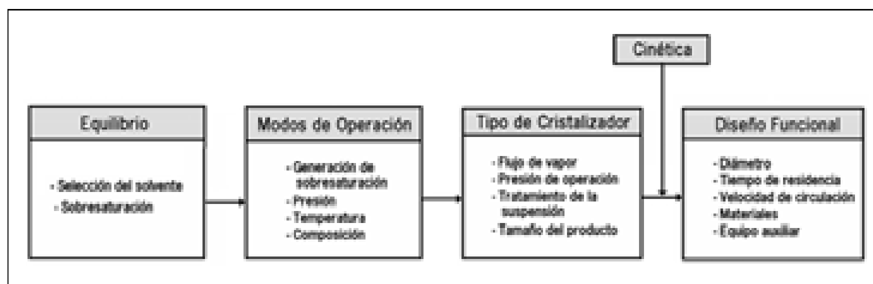


Figura 12.2: Estrategia de diseño de un cristalizador. Adaptada de: Moyers y Rousseau, 1987.

los modos como se puede efectuar la operación y la cinética de la cristalización. En la sección 12.3 se describen los equipos de cristalización más empleados. El diseño de cristalizadores se presenta en la sección 12.4.

12.2. Fundamentos

Para evaluar el uso de la operación de cristalización como alternativa para la purificación de un producto, es necesario contar con determinada información básica relacionada con el producto y sus soluciones como:

- Tipo de cristales que forma el producto.
- Pureza de los cristales en el producto.
- Equilibrio: Solubilidad y sobresaturación de soluciones del soluto en agua u otro solvente.
- Modos de operación posibles para generar la sobresaturación de la solución del soluto.
- Cinética: Velocidad con que se originan (nucleación) y aumentan de tamaño los cristales en la solución (crecimiento).
- Distribución de tamaños en poblaciones de los cristales.

12.2.1. Tipos de Cristales

Un cristal es un sólido compuesto por átomos, iones o moléculas dispuestos en un arreglo tridimensional ordenado y periódico (retícula espacial). La distancia entre los átomos del cristal de cualquier material es constante y característica de dicho material. Los ángulos entre las caras de los cristales también son característicos y dan origen a cinco tipos básicos de cristales y a siete sistemas cristalográficos. En el sistema más sencillo, el sistema cristalográfico cúbico, tanto

las distancias características (largo, ancho y alto) como los tres ángulos característicos son iguales. Otros tipos de sistemas difieren de este comportamiento originando los sistemas tetragonal, ortorrómbico, hexagonal, monoclínico, triclínico y trigonal.

Desde el punto de vista industrial el término "hábitat del cristal" se refiere a los tamaños relativos de las caras del cristal. El hábitat de un cristal es de gran importancia: los cristales largos como agujas se rompen muy fácilmente durante su centrifugación y secado; los cristales en forma de disco son difíciles de lavar durante su centrifugación y difíciles de filtrar. Los cristales esféricos son los más fáciles de manejar.

12.2.2. Pureza de los Cristales

La mayoría de las soluciones cuando forman cristales a velocidades de crecimiento moderadas y a condiciones constantes, los cristales formados sólo contienen un componente alcanzado purezas hasta de 99.8 %.

Las impurezas de los cristales generalmente se deben al atrapamiento de líquido en el cristal en pequeñas bolsas u oclusiones. Además de este tipo de impureza, normalmente después de la separación de los cristales de la solución, parte de la solución queda adherida a la superficie del cristal, lo que hace necesario lavar los cristales.

La separación alcanzada en una cristalización puede ser caracterizada mediante el factor de separación β, que es una medida de la distribución del soluto y las impurezas entre las fases, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\beta = \frac{E_A}{E_B} \tag{12.1}$$

donde:

$$E_A = \frac{\text{masa de soluto A en la fase cristalina}}{\text{masa de soluto A en la fase líquida}} \tag{12.2}$$

de manera similar para la impureza B,

$$E_B = \frac{\text{masa de impureza B en la fase cristalina}}{\text{masa de impureza B en la fase líquida}} \tag{12.3}$$

El grado de separación o selectividad del proceso es mayor conforme β aumenta. El factor de cristalización E (análogo al factor de extracción) depende de la naturaleza del sistema solvente-soluto-impurezas, de las condiciones de temperatura y presión a las que se realice la cristalización, y del grado de saturación (sobresaturación) empleado en la operación.

12.2.3. Equilibrio: Solubilidad y Sobresaturación

Solubilidad

Las relaciones de equilibrio para los sistemas de cristalización se presentan en forma de curvas de solubilidad (Fig. 12.3). En estas curvas la solubilidad se

expresa comúnmente en porciento de peso de soluto a peso de solvente.

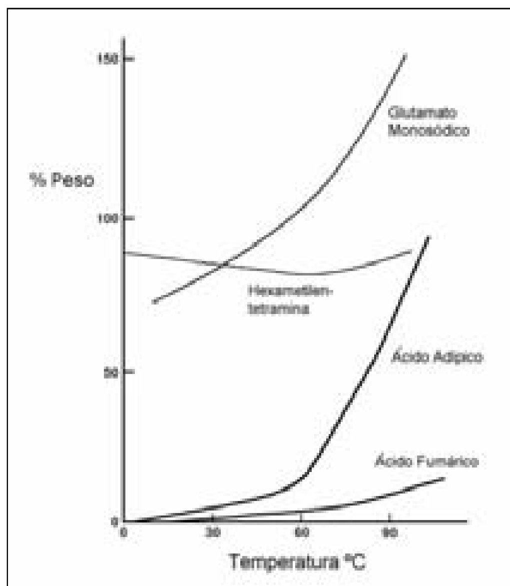


Figura 12.3: Curva de solubilidad. Tomada de: Belter *et al.*, 1988.

Las curvas de solubilidad representan la solubilidad de soluciones saturadas a diferentes temperaturas. Esta solubilidad es la máxima que puede alcanzar la solución en forma termodinámicamente estable. La saturación es resultado del equilibrio entre la fase sólida y la fase líquida, y consecuencia de la igualación de sus potenciales químicos.

Los datos experimentales de equilibrio sirven de base para la evaluación de las diversas opciones que existen para llevar a cabo un proceso de cristalización ya que permiten, entre otras cosas: a) determinar si el sólido que se cristaliza sólo contiene el soluto de interés, b) seleccionar el solvente, c) establecer el rango de temperatura y presión de operación, d) conocer la concentración del líquido a la salida del cristalizador y e) determinar la recuperación máxima posible de la operación.

Con ayuda de la Figura 12.3 se pueden describir algunos comportamientos generales de la solubilidad de las sustancias en función de la temperatura:

a) Existen sustancias como la hexametilentetramina cuya solubilidad no varía apreciablemente con la temperatura.

b) Otras sustancias como el ácido fumárico muestran un incremento moderado en solubilidad con respecto a la temperatura.

c) Algunas sustancias como el ácido adípico y el glutamato monosódico muestran una gran dependencia de su solubilidad con la temperatura.

El conocimiento del comportamiento de la solubilidad de una sustancia es

básico en la selección del modo para realizar su cristalización: Es factible obtener cristales de ácido adípico por enfriamiento de una solución de éste, pero no es factible obtener cristales de hexametilentetramina por este mismo método.

Ejemplo 12.1. Solubilidad de l-serina. Se determinó la solubilidad de l-serina en agua en el rango de 35 - 50 °C (Charmolue y Rousseau, 1991). Los datos experimentales se ajustaron a la recta dada por:

$$S = 146.13 + 8.083\ T_C$$

donde T_C es la temperatura en grados centígrados y S es la solubilidad de la l-serina en g/1000 g de agua.

La solubilidad de l-serina también fue obtenida a partir de la teoría de las soluciones ideales que es aplicable a sistemas donde existe similitud química entre el soluto y el solvente, y se expresa como:

$$\ln\left(\frac{1}{X_2}\right) = \frac{\Delta H_m^f}{RT_m}\left(\frac{T_m}{T} - 1\right)$$

donde:

X_2: Fracción mol en la saturación.

ΔH_m^f: Entalpia de fusión en el punto de fusión.

T_m: Temperatura de fusión en grados Kelvin.

T: Temperatura en grados Kelvin.

Para l-serina la temperatura de fusión T_m es de 501 °K y la entalpia de fusión ΔH_m^f se ha estimado en $4,230.82$ cal/mol.

Se pide: A partir de la información anterior comparar los resultados experimentales con los derivados de la teoría de las soluciones ideales para l-serina.

Solución:

Sustituyendo valores en la ecuación de las soluciones ideales se tiene:

$$\ln\left(\frac{1}{X_2}\right) = \left(\frac{4,230.82\ \dfrac{\text{cal}}{\text{mol}}}{1.987\ \dfrac{\text{cal}}{\text{mol} - {}^\circ\text{K}} \times 501^\circ\text{K}}\right)\left(\frac{501}{T} - 1\right)$$

de tal manera que:

$$X_2 = \exp\left[-4.25\left(\frac{501}{T} - 1\right)\right]$$

La solubilidad S en g/1000 g de agua puede obtenerse mediante la expresión:

$$S = (M_2)\left(\frac{1000}{M_1}\right)\left(\frac{X_2}{1 - X_2}\right)$$

donde M_1=18 y M_2=105.1 en g/mol, son los pesos moleculares del agua y la l-serina , respectivamente; con estos valores la expresión anterior puede ser escrita como:

$$S = 5,838.89 \left(\frac{X_2}{1 - X_2} \right)$$

combinando ambas expresiones, la solubilidad teórica de la l-serina es:

$$S = \frac{5,838.89}{\exp \left[4.25 \left(\frac{501}{T} - 1 \right) \right] - 1}$$

En la Figura 12.4 se muestra una comparación de los datos experimentales de solubilidad de l-serina con los que predice la teoría de las soluciones ideales.

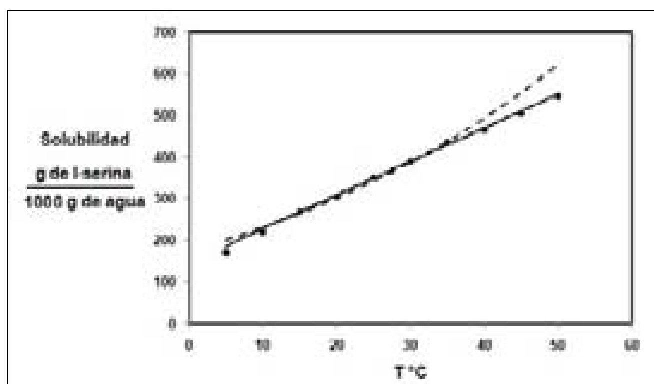


Figura 12.4: Solubilidad de l-serina. (•) datos experimentales, (–) recta ajustada y (- - -) solución ideal. Fuente: Charmolue y Rousseau, 1991.

Sobresaturación

Pudiera pensarse que una solución con una concentración de soluto mayor a la de saturación forma inmediatamente cristales pequeños o núcleos. Sin embargo, actualmente es bien conocido que bajo diferentes condiciones una solución puede contener más soluto que el correspondiente a la saturación, formando lo que se conoce como solución sobresaturada. El estudio del fenómeno de sobresaturación es fundamental en el diseño de cristalizadores.

La curva de solubilidad (Fig. 12.5) separa dos regiones: a) la región de subsaturación donde una solución es capaz de disolver más soluto a las condiciones dadas y b) la región de sobresaturación.

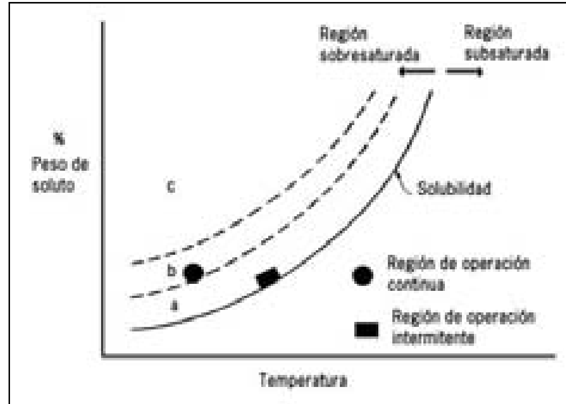


Figura 12.5: Zonas de sobresaturación. (a) metaestable, (b) intermedia y (c) lábil.

El comportamiento de las soluciones en la región de sobresaturación fue descrito por H.A. Miers (Martino *et al.*, 2007) a fines de los años veinte. Estos estudios han conducido a dividir la región de sobresaturación en tres zonas cuya delimitación no es muy precisa: a) la región metaestable, donde el soluto en exceso a la concentración de equilibrio se deposita en cristales ya existentes (sembrados o formados por nucleación) pero no forma cristales nuevos o núcleos, b) la región intermedia, donde el soluto en exceso a la concentración de equilibrio se deposita en cristales existentes y forma nuevos cristales o núcleos y c) la región lábil, donde la formación de cristales nuevos o núcleo ocurre en forma espontánea a partir de una solución que no contiene cristales o semillas.

A diferencia de la solubilidad de equilibrio, los límites de estas tres zonas se controlan no sólo por el equilibrio, sino también por los parámetros del proceso como el grado de agitación.

El conocimiento de la región de sobresaturación permite determinar regiones de operación. En el caso de una operación por lotes, con el propósito de lograr un tamaño de cristal lo más uniforme posible, el grado de sobresaturación se mantiene en la región metaestable, de tal manera que la sobresaturación generada sirva para el crecimiento de los cristales ya existentes (sembrados) y no exista formación de cristales nuevos.

En una cristalización continua la sobresaturación debe ser mantenida en el límite inferior de la región intermedia, de tal manera que el número de cristales que se retiran en la corriente de salida sea igual al número de cristales generados por nucleación. Además, es necesario proveer un mecanismo de clasificación de cristales, de tal manera que sólo se retiren cristales de un mismo tamaño. Esto se logra utilizando un lecho fluidizado de cristales, el cual proporciona una área adecuada para remover la sobresaturación mediante el crecimiento de los cristales.

12.2.4. Selección del Modo de Operación

El modo de operación en una cristalización es la técnica empleada para generar la sobresaturación de la solución. La selección del modo de operación está fuertemente influenciada por las características de la solubilidad en equilibrio del sistema. Una vez que se ha seleccionado el modo de operación del cristalizador es posible desarrollar los balances de masa y energía del sistema.

Los principales modos para generar la sobresaturación (Fig. 12.6) son por: a) enfriamiento, b) enfriamiento evaporativo, c) evaporación térmica y d) evaporación térmica al vacío.

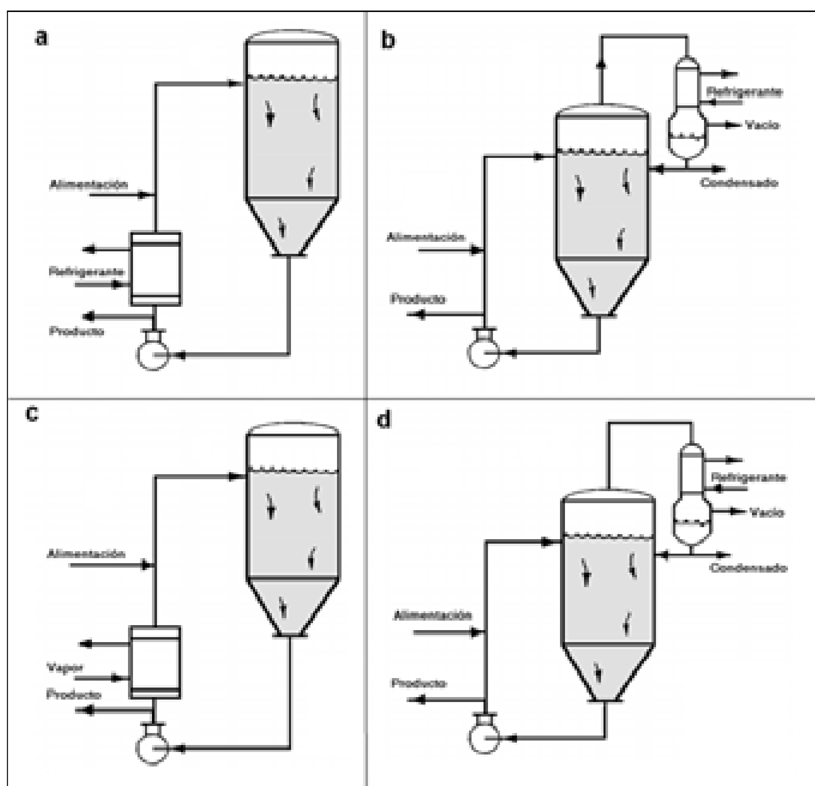


Figura 12.6: Modos para generar sobresaturación. a) Enfriamiento, b) Enfriamiento evaporativo, c) Evaporación térmica y d) Evaporación térmica al vacío. Adaptada de: Moyers y Rousseau, 1987.

Sobresaturación por enfriamiento

Cuando la solubilidad del soluto varía sensiblemente con la temperatura, el enfriamiento de la solución a tratar permite la formación de cristales con altos rendimientos y bajo consumo energético. Este enfriamiento puede realizarse en forma externa mediante un intercambiador, o directamente utilizando un líquido refrigerante inmiscible con la solución y con propiedades termodinámicas que minimicen el trabajo de compresión necesario. En este tipo de operación la evaporación de solvente es mínima.

Recientemente, se ha combinado la técnica de enfriamiento con el uso de antisolventes, que son sustancias que se añaden al medio para mejorar la cristalización, ya sea por disminuir la solubildad o cambiar una propiedad química como el pH (Lindenberg *et al.*, 2009).

Sobresaturación por enfriamiento evaporativo

En este modo el enfriamiento se produce con auxilio de un sistema de vacío. La alimentación entra a una temperatura mayor que la mantenida dentro del cristalizador enfriándose adiabáticamente dentro de éste. Este modo también es aplicable cuando la solubilidad del soluto es muy sensible a la temperatura.

Sobresaturación por evaporación térmica

En este modo se transfiere calor al sistema para evaporar solvente y generar la formación de cristales por "salting out". Este modo se emplea sólo cuando la solubilidad del soluto es insensible a la temperatura.

Sobresaturación por evaporación térmica al vacío

En este modo la alimentación tiene una temperatura mayor que la mantenida en el cristalizador y al entrar se enfría adiabáticamente. Paralelamente se transfiere calor al sistema para evaporar solvente con auxilio de un sistema de vacío. Este modo es empleado para la cristalización de solutos cuya solubilidad tiene una dependencia intermedia respecto a la temperatura.

12.2.5. Cinética de la Cristalización

Los fenómenos cinéticos asociados a la cristalización son la nucleación o formación de cristales nuevos, y el crecimiento de éstos. La fuerza impulsora de ambos fenómenos es la sobresaturación. A niveles elevados de sobresaturación ambos fenómenos compiten por el soluto disponible.

Nucleación

La velocidad de nucleación afecta el tamaño que los cristales pueden alcanzar en un cristalizador por lotes. Conforme mayor sea la velocidad de nucleación menor es el tamaño de los cristales obtenidos. En el caso de una cristalización

continua el aumento de la velocidad de nucleación se traduce en un mayor tiempo de residencia de los cristales.

Existen dos mecanismos de formación de cristales: a) nucleación primaria y b) nucleación secundaria.

Nucleación primaria En la nucleación primaria el cristal nuevo se origina espontáneamente a partir de la solución sobresaturada (nucleación homogénea) o bien se origina a partir de un material insoluble, ya sean impurezas o cristales del mismo material previamente sembrados (nucleación heterogénea).

Nucleación secundaria Es la formación de cristales nuevos como resultado de la presencia de cristales ya crecidos de soluto. Puede originarse por medio de varios mecanismos como:

a) Sembrado. Al colocarse cristales del material en una solución sobresaturada, se piensa que el cristal libera pequeños cristales que se formaron durante el proceso de secado y que dan origen a nuevos cristales.

b) Contacto. Consiste en la producción de cristales nuevos mediante el rompimiento de los cristales por choques entre sí o con las diferentes partes del equipo: tanque, bombas y agitadores.

c) Esfuerzo cortante. Cuando la solución sobresaturada fluye sobre la superficie de los cristales se considera que puede despegar segmentos de cristal, que pueden a su vez originar nuevos cristales.

Velocidad de nucleación La velocidad de nucleación es función de la sobresaturación y del mecanismo que la origina. En general se observa que la dependencia de la velocidad de nucleación primaria con la sobresaturación es de mayor orden que la de la velocidad de nucleación secundaria. Esto se muestra en la Figura 12.7 en forma cualitativa.

La mayoría de los cristalizadores operan en la región de baja sobresaturación para que el crecimiento del cristal sea regular y el producto puro. Por tal motivo la nucleación secundaria es la más empleada a nivel industrial. Por otro lado, los mecanismos para controlar la nucleación secundaria pueden establecerse con relativa facilidad a ese nivel.

Ante la carencia de una descripción matemática detallada que englobe los diferentes mecanismos de nucleación posibles, la velocidad de nucleación generalmente se expresa por medio de una correlación empírica de la siguiente forma:

$$B = \frac{dN}{dt} = k_n(c - c^*)^i \tag{12.4}$$

donde:

B: Velocidad de nucleación. [núcleos/t-L^3].

k_n: Parámetro empírico.

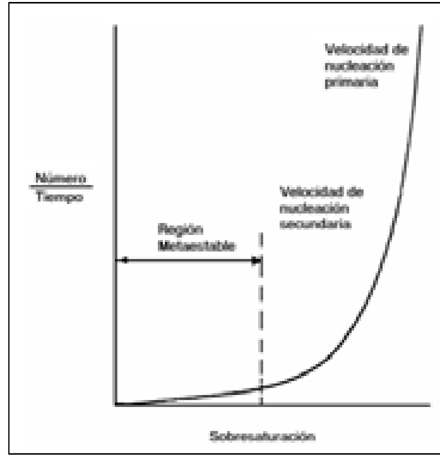


Figura 12.7: Influencia de la sobresaturación sobre la velocidad de nucleación. Adaptada de: Moyers y Rousseau, 1987. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons. Copyright ©1987. Todos los derechos reservados.

i: Parámetro empírico.

$(c - c^*)$: Sobresaturación. $[M/L^3]$.

c: Concentración de soluto en la solución. $[M/L^3]$.

c^*: Concentración de saturación del soluto. $[M/L^3]$.

N: Número de núcleos por unidad de volumen de solvente. $[M/L^3]$.

Crecimiento

El crecimiento de cristales es un fenómeno cuya fuerza impulsora también es la sobresaturación. El crecimiento de un cristal es un proceso de adición capa por capa. En la Figura 12.8 se muestra el proceso donde un cristal cúbico ideal crece por adición de pequeños cubos sobre su superficie.

Velocidad de crecimiento El crecimiento sólo puede ocurrir en la superficie del cristal y las resistencias involucradas en el crecimiento son la de la difusión del soluto hasta la superficie del cristal y la resistencia a la integración del soluto a la superficie del cristal; dado que estas resistencias actúan en serie, la velocidad de crecimiento de un cristal se puede expresar en forma empírica como:

$$\frac{dM_c}{dt} = K_c A (c - c^*)^g \tag{12.5}$$

en la ecuación anterior K_c está dada por:

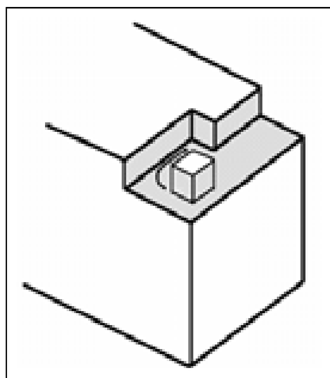


Figura 12.8: Crecimiento de un cristal. Tomada de: Bennett, 1973.

$$K_c = \frac{1}{\left(\frac{1}{k_L} + \frac{1}{k_S}\right)} \tag{12.6}$$

donde:

M_c: Masa del cristal. $[M]$.

t: Tiempo. $[t]$.

g: Parámetro empírico.

K_c: Coeficiente global de transferencia de masa. $[L/t]$.

k_L: Coeficiente transferencia de masa en la película. $[L/t]$.

k_S: Velocidad específica de integración del soluto a la superficie del cristal. $[L/t]$.

$(c - c^*)$: Sobresaturación. $[M/L^3]$.

A: Área del cristal. $[L^2]$.

En sistemas no agitados la velocidad de crecimiento está controlada por la difusión y el término $1/k_S$ se cancela de la ecuación (12.6). Cuando la velocidad de agitación es alta el término $1/k_L$ es el que puede ser despreciado.

El coeficiente k_L es función de algunos parámetros como la agitación y la viscosidad del medio, mientras que k_S no lo es. Por otro lado, k_L varía ligeramente con la temperatura, mientras que k_S generalmente es una función exponencial de ésta y puede cambiar dramáticamente durante un proceso de enfriamiento.

Longitud característica Uno de los objetivos de la cristalización es producir cristales de tamaño uniforme, por tal motivo la velocidad de crecimiento de un cristal generalmente se asocia a una longitud característica medible. Esta longitud puede ser determinada por varios métodos, siendo el más utilizado el del tamizado de los cristales bajo estudio.

Se puede asociar la velocidad de crecimiento de un cristal expresada en unidades de masa por unidad de tiempo, con una velocidad expresada en longitud por unidad de tiempo, partiendo de la siguiente relación conocida:

$$M_c = \rho_c V_c \tag{12.7}$$

donde ρ_c y V_c son la densidad y el volumen de un cristal, respectivamente.

Si se supone que el cristal mantiene una similitud geométrica durante su crecimiento, una longitud característica del cristal que sea seleccionada mantendrá una proporción constante con las otras dimensiones. Con base a lo anterior, la ecuación (12.7) puede ser expresada en función de esta longitud característica de la siguiente manera:

$$M_c = \rho_c(\phi_V l^3) \tag{12.8}$$

donde ϕ_V es un factor geométrico que relaciona la longitud característica l del cristal, con su volumen $V_c = \phi_V l^3$.

De igual manera el área del cristal puede relacionarse con la longitud característica mediante:

$$A = \phi_A l^2 \tag{12.9}$$

donde ϕ_A es un factor geométrico de área.

Ejemplo 12.2. Longitud característica y factores geométricos.

Se pide: Determinar la longitud característica y los factores geométricos de área y volumen para:

a) Una esfera.

b) Un cubo.

Solución:

a) El área y volumen de una esfera de diámetro d son:

$$A = \pi d^2; \quad V = \frac{\pi}{6} d^3$$

de tal manera que:

$$l = d; \quad \phi_A = \pi; \quad \phi_V = \frac{\pi}{6}$$

b) En el caso de un cubo de lado L,

$$A = 6L^2; \quad V = L^3$$

de tal manera que:

$$l = L; \quad \phi_A = 6; \quad \phi_V = 1$$

Velocidad de crecimiento y longitud característica Se puede combinar la ecuación (12.5) con las ecuaciones (12.8) y (12.9) para obtener una expresión de la velocidad del crecimiento de un cristal en función de una longitud característica,

$$\frac{d(\rho_c \phi_V l^3)}{dt} = (K_c)(\phi_A l^2)(c - c^*)^g \tag{12.10}$$

o bien,

$$\frac{dl}{dt} = \left[\left(\frac{K_c}{\rho_c}\right)\left(\frac{\phi_A}{3\phi_V}\right)\right](c - c^*)^g \tag{12.11}$$

La ecuación (12.11) puede escribirse en forma simplificada de la siguiente manera:

$$\frac{dl}{dt} = k_g(c - c^*)^g \tag{12.12}$$

donde k_g es la constante cinética de crecimiento de un cristal.

La velocidad de crecimiento expresada en función de una longitud característica se simboliza como G, de tal manera que:

$$G = k_g(c - c^*)^g \tag{12.13}$$

Las ecuaciones (12.4) y (12.13) describen la velocidad de formación y crecimiento de cristales, respectivamente. Ambos fenómenos dependen de la sobresaturación pero son independiente del tamaño de los cristales ya formados.

Ley delta L: ΔL

Se ha demostrado experimentalmente que todos los cristales de un material que son geométricamente similares, cuando crecen en una misma solución crecen a una velocidad constante e igual para todos los tamaños de cristal, cuando la velocidad es medida en función de una longitud característica. Es decir este tipo de cristales cumplen con la ecuación (12.13).

12.2.6. Distribución de Tamaño en Poblaciones de Cristales

Para caracterizar una operación de cristalización también es necesario describir la distribución del tamaño de los cristales en una suspensión o "magma". Este tipo de distribución es necesaria para realizar los balances de masa y energía en los cristalizadores.

La distribución de tamaños de una población de cristales, generalmente se describe por medio de una curva de densidad poblacional como la que se muestra en la Figura 12.9. Un punto sobre la curva relaciona a l_i con N_i, donde l_i es una longitud dada de cristal y N_i es el número de cristales por unidad de volumen de solvente, con una longitud entre 0 y l_i.

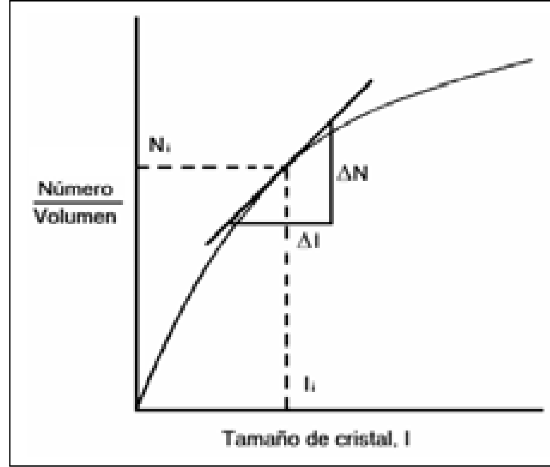


Figura 12.9: Curva de densidad poblacional. Adaptada de: Belter *et al.*, 1988. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons. Copyright ©1988. Todos los derechos reservados.

La pendiente de la curva permite obtener la densidad poblacional n que es una medida del número de cristales por unidad de volumen en un intervalo diferencial de longitud; es decir,

$$n = \frac{\lim}{\Delta l \to 0}\left(\frac{\Delta N}{\Delta l}\right) = \frac{dN}{dl} \tag{12.14}$$

El uso apropiado de la variable densidad de población n permite estimar importantes características de una población de cristales, mediante los momentos fraccionarios de esta distribución.

Análisis de momentos de la distribución de tamaño

De acuerdo a la definición de momentos de una distribución, el momento fraccionario k de la distribución de tamaños de cristales está dado por:

$$\mu_k = \frac{\int_o^l l^k\,[n(l)]\,dl}{\int_o^\infty l^k\,[n(l)]\,dl} \tag{12.15}$$

donde $n(l)$ es la densidad poblacional para el tamaño l. Existen cuatro casos particulares de interés:

a) Para $k = 0$, el momento fraccionario μ_0 representa la fracción del número de cristales de una población que tiene un tamaño entre 0 y l,

$$\mu_0 = \frac{\int_o^l [n(l)]\, dl}{\int_o^\infty [n(l)]\, dl} \tag{12.16}$$

b) Para $k = 1$, el momento fraccionario μ_1 es la fracción que representa la suma de las longitudes de los cristales de tamaño entre 0 y l, de la longitud total de los cristales de una población.

$$\mu_1 = \frac{\int_o^l l\, [n(l)]\, dl}{\int_o^\infty l\, [n(l)]\, dl} \tag{12.17}$$

c) Para $k = 2$, el momento fraccionario μ_2 es la fracción que representa la suma del área de los cristales de tamaño entre 0 y l, del área total de una población de cristales.

$$\mu_2 = \frac{\phi_A \int_o^l l^2\, [n(l)]\, dl}{\phi_A \int_o^\infty l^2\, [n(l)]\, dl} \tag{12.18}$$

d) Para $k = 3$, el momento fraccionario μ_3 es la fracción que representa la masa de los cristales de tamaño entre 0 y l, de la masa total de una población de cristales.

$$\mu_3 = \frac{\rho_c \phi_V \int_o^l l^3\, [n(l)]\, dl}{\rho_c \phi_V \int_o^\infty l^3\, [n(l)]\, dl} \tag{12.19}$$

12.3. Equipos de Cristalización

La selección del tipo de cristalizador está influenciada tanto por el volumen de producción como por el modo de operación seleccionado. En general los equipos de cristalización pueden operar en dos formas:

- Por lotes.
- Continua.

12.3.1. Cristalizadores por Lotes

Los cristalizadores por lotes son tanques agitados con sistemas de vacío y enfriamiento (Fig. 12.10). El ciclo de la cristalización dura entre 2 y 8 horas. Al final del ciclo, el material cristalizado se retira del cristalizador para lavarse y secarse. La mayoría de los productos biotecnológicos que involucran una cristalización se obtienen en operaciones por lotes.

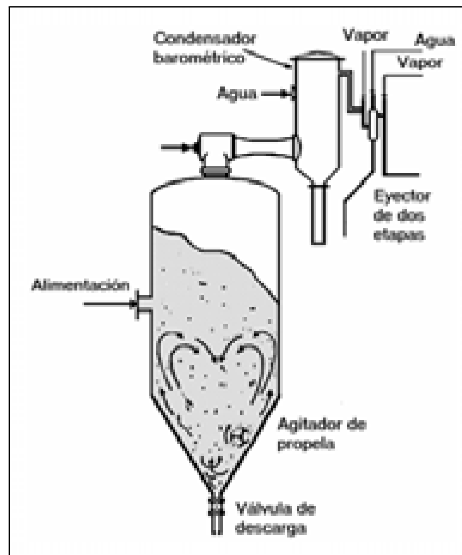


Figura 12.10: Cristalizador por lotes. Adaptada de: Bennett, 1988. Reproducida con el permiso de McGraw-Hill Inc. Copyright ©1988. Todos los derechos reservados.

12.3.2. Cristalizadores Continuos

Existen tres tipos básicos de cristalizadores continuos: a) Cristalizador-Evaporador con circulación de líquido (también llamado cristalizador con clasificación de la suspensión o tipo Oslo), b) Cristalizador al vacío y con circulación forzada de magma y c) Cristalizador con tubo de tiro y mampara.

Cristalizador-Evaporador con circulación de líquido

En el Cristalizador-Evaporador con circulación de líquido (Fig. 12.11) la sobresaturación se produce por evaporación. La alimentación concentrada y caliente se mezcla con la corriente de recirculación y se bombea a la cámara de evaporación donde el solvente se evapora adiabáticamente con ayuda de un sistema de vacío. El líquido sobresaturado fluye hacia la parte inferior del cristalizador a través de un tubo de bajada y después hacia arriba a través de un lecho fluidizado de cristales que permite una liberación efectiva de la sobresaturación. Los cristales más grandes sedimentan y son retirados por el fondo del cristalizador. Los cristales más finos pueden ser retirados por la parte superior para incrementar el tamaño de los cristales.

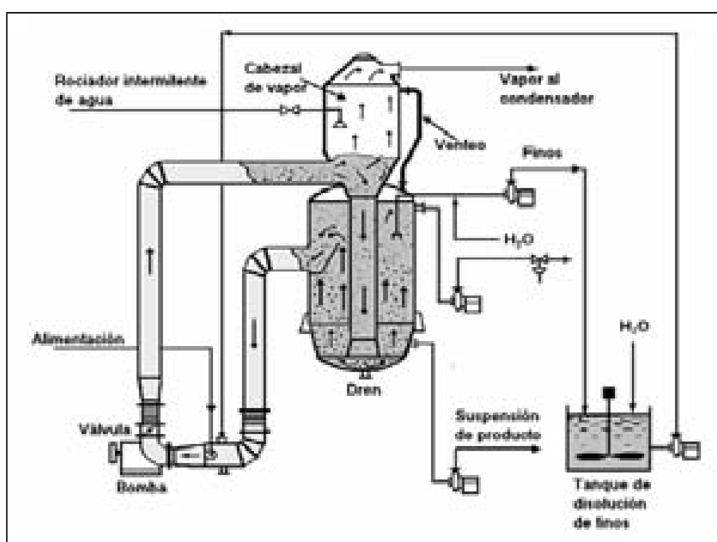


Figura 12.11: Cristalizador-Evaporador con circulación de líquido. Adaptada de: Bennett, 1988.

Cristalizador al vacío y circulación forzada de magma

El cristalizador al vacío y circulación forzada de magma (Fig. 12.12), también conocido como cristalizador con Remoción de Producto Mezclado y Suspensión Mezclada (RPMSM) consta de un cuerpo principal dimensionado para la liberación del vapor con un nivel de líquido apropiado para retener los cristales en crecimiento.

La alimentación se mezcla con la corriente de salida del cuerpo principal y se hace pasar por un intercambiador donde se eleva su temperatura entre 2 y 6 °C. La suspensión en la superficie del cristalizador libera parte del solvente

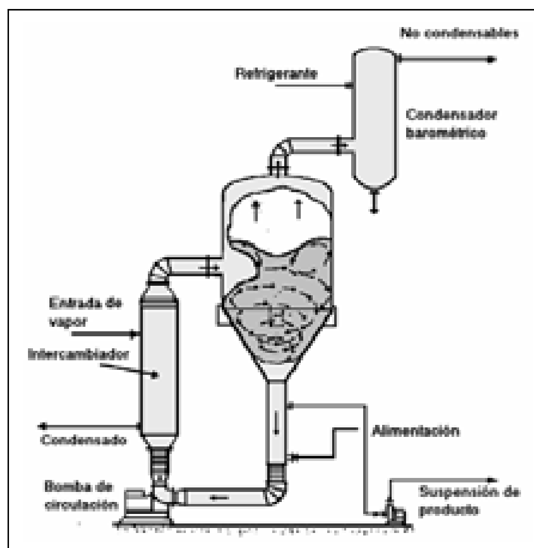


Figura 12.12: Cristalizador al vacío y circulación forzada de magma . Adaptada de: Bennett, 1988.

produciéndose la sobresaturación.

Cristalizador con tubo de tiro y mampara

En el cristalizador con tubo de tiro y mampara (Fig. 12.13), los cristales de mayor tamaño que sedimentan en el fondo del cristalizador son impulsados hacia la región superior donde se efectúa la evaporación y se origina la sobresaturación, mediante un impulsor grande que se mueve a bajas velocidades. Una mampara externa al tubo de tiro permite formar una zona de sedimentación externa, a partir de la cual los cristales finos pueden ser retirados para incrementar el tamaño del cristal. La alimentación mezclada con la corriente de finos se hace pasar por un intercambiador de calor y se introduce por la parte inferior del cristalizador.

12.4. Diseño de Cristalizadores

Actualmente se han logrado avances importantes en la modelación de cristalizadores para su análisis, diseño y optimización, en aplicaciones a situaciones de importancia industrial. Sin embargo, existen aún varias limitaciones debido a lo complejo que resulta describir de manera racional la forma como se relacionan los fenómenos de nucleación y crecimiento de cristales, con las variables de operación y la configuración de los cristalizadores.

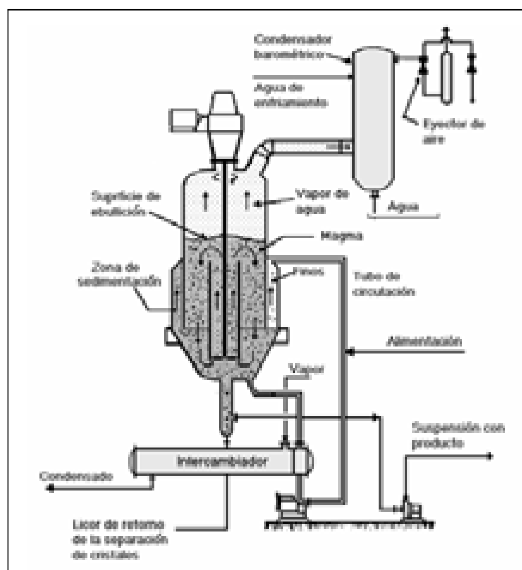


Figura 12.13: Cristalizador con tubo de tiro y mampara. Adaptada de: Bennett, 1988.

En esta sección se describe cómo se combinan los balances poblacionales de cristales, los balances de masa y los balances de energía en el diseño de tres sistemas de interés en cristalización:

- Cristalizador por lotes.
- Cristalizador continuo.
- Cristalizador continuo con remoción selectiva.

12.4.1. Cristalizadores por Lotes

La cristalización por lotes es muy utilizada en la fase de acabado de la producción de antibióticos, ácido cítrico y varios otros productos de peso molecular intermedio, cuyos volúmenes de producción son bajos (menores a 50 ton/día) y la alimentación disponible es intermitente.

La forma de generar la sobresaturación o modo de operación determina en gran medida el rendimiento y la distribución del tamaño de cristales en la operación por lotes. Sin embargo, la operación por lotes tiene una mayor dependencia de la forma como se genera la sobresaturación. Cuando ésta se genera por enfriamiento existen varias formas de realizarla:

a) Enfriamiento con una fuente externa de temperatura constante.

b) Enfriamiento a velocidad de transferencia de calor constante.

c) Enfriamiento a sobresaturación constante.

d) Enfriamiento a velocidad controlada para optimizar el tamaño de cristal y la pureza.

El desarrollo de modelos y el análisis de los cristalizadores por lotes está limitado por la disponibilidad de datos cinéticos de velocidad de crecimiento de cristales y de nucleación. En términos generales los métodos de diseño y análisis de cristalizadores por lotes están menos desarrollados que los de los cristalizadores continuos (Abbas y Romagnoli, 2007). Por otro lado, existe un creciente interés en los experimentos por lotes dado que se puede obtener más información en un solo experimento y de cierta forma son más fáciles que los experimentos continuos.

Uno de los principales problemas de los cristalizadores por lotes es mantener la distribución de tamaño de cristales entre una corrida y otra. Esto se evita mediante el sembrado de cristales, y mediante el control de las condiciones de mezclado y enfriamiento.

Los experimentos con cristalizadores por lotes sembrados permiten generar expresiones cinéticas de crecimiento cuando se suprime la nucleación. Para obtener la información relativa a la nucleación, se requiere efectuar mediciones de distribución de tamaño mediante experimentos donde se varía: la concentración inicial de soluto, la temperatura final o el tiempo de operación. Debido a lo anterior, el diseño de operaciones de cristalización por lotes requiere la generación de información experimental para determinar aspectos como: a) rendimiento potencial de la operación, b) pureza de los cristales, c) permeabilidad del lecho de cristales, d) curva de solubilidad-temperatura y e) distribución de tamaño de cristales.

Una de las desventajas de la cristalización por lotes sin control de la velocidad de enfriamiento, consiste en que este modo de operación produce generalmente un producto de baja pureza y baja uniformidad. Esto se debe a que las velocidades de enfriamiento son más altas al inicio del proceso, generando un exceso de nucleación con la consecuente disminución de tamaño de cristal dominante, así como efectos de incrustamiento sobre las paredes de enfriamiento que reducen la transferencia de calor. Esto puede ser minimizado mediante un control de temperatura que permita una velocidad de enfriamiento variable.

Balance poblacional

La descripción de la cristalización se realiza mediante balances poblacionales de cristales. Estos balances consideran que el número de cristales es una cantidad balanceable. Se supone que los cristales son lo suficientemente numerosos y pequeños, de tal manera que su distribución de tamaño puede considerarse una función continua de la longitud característica o tamaño del cristal. Se supone además en el siguiente caso que no ocurre rompimiento ni aglomeración de cristales.

El balance poblacional de cristales en un cristalizador considerando sólo los cristales en un rango de tamaño $dl = l_2 - l_1$, puede expresarse en palabras como:

[La variación con el tiempo, al interior del cristalizador, del número de cristales de tamaño en el rango dl] =

[La velocidad de entrada en la alimentación de cristales de tamaño en el rango dl] −

[La velocidad de salida del cristalizador de cristales de tamaño en el rango dl] +

[El número de cristales por unidad de tiempo que al crecer en el cristalizador entran al rango de tamaño dl] −

[El número de cristales por unidad de tiempo que al crecer en el cristalizador salen del rango de tamaño dl]

El balance se expresa matemáticamente como:

$$\frac{\partial}{\partial t}(Vn) = F_A n_A - Fn - V\frac{\partial(nG)}{\partial l} \tag{12.20}$$

Si consideramos un cristalizador por lotes donde:
a) No hay entrada ni salida de cristales.
b) El volumen es constante.
c) El cristalizador está perfectamente agitado y no existen pérdidas de solvente.
d) No existe variación del número de cristales por aglomeración o rompimiento.
e) Todos los cristales crecen a la misma velocidad.
El balance poblacional en el cristalizador por lotes es:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + G\frac{\partial n}{\partial l} = 0 \tag{12.21}$$

El balance de masa de soluto en el cristalizador se puede expresar como:

$$\frac{dC}{dt} = -\left(\frac{\rho_p}{M_p}\right)\phi_A G\int_0^\infty nl^2 dl \tag{12.22}$$

Las ecuaciones anteriores están acopladas y tienen que ser resueltas simultáneamente mediante métodos numéricos apropiados (Kumar *et al.*, 2009; Qamara *et al.,* 2006). Los métodos utilizados se pueden dividir en seis tipos: a) momentos, b) características, c) colocación ortogonal, d) simulación Monte Carlo, e) diferencias finitas y f) volumen finito.

Ejemplo 12.3 Cristalización por enfriamiento en lotes de paracetamol.

Se realiza la cristalización de paracetamol a partir de una solución de etanol en un cristalizador por lotes enchaquetado de 500 mL, que se puede considerar

perfectamente mezclado, mediante un agitador de 4 paletas que gira a 400 rpm con un $Re = 9000$ (Barthe y Rousseau, 2006). El fenómeno de cristalización se cuantifica mediante la técnica de medidor de la reflectancia del haz focalizado (FBRM) que forma parte de las tecnologías analíticas de proceso (PAT) con mayor potencial para monitoriar las operaciones de cristalización (Yu *et al.*, 2004).

La solución se añade al cristalizador y se acondiciona a 70 °C por 20 min. Posteriormente se enfría a una velocidad de $Ve = 0.2$ °C/min hasta alcanzar una temperatura de 10 °C. Después de este periodo se mantiene la temperatura constante.

La solubilidad del paracetamol en la solución está dada por la siguiente correlación:

$$C^* = \frac{\left(2.955 \times 10^{-4}\right) \exp(2.179 \times 10^{-2} \times T)}{M_p \left[\frac{\left(2.955 \times 10^{-4}\right) \exp(2.179 \times 10^{-2} \times T)}{\rho_p} + \frac{1}{\rho_s}\right]}$$

La velocidad de nucleación homogénea puede expresarse como (Omar *et al.*, 2006):

$$B = k_b \exp\left\{\frac{-16\pi\gamma^3 \left(\frac{M_p}{\rho_p N_A}\right)^2}{3k_B^3 T^3 \left[\ln\left(\frac{C}{C^*}\right)\right]^2}\right\}$$

En la expresión anterior, la energía interfacial sólido-líquido γ está dada por la siguiente expresión:

$$\gamma = 0.414 k_B T \left(\frac{\rho_p N_A}{M_p}\right)^{\frac{2}{3}} \ln\left(\frac{C_s}{C^*}\right)$$

La cinética de crecimiento de cristales determinada experimentalmente y la variación de la constante específica de crecimiento con la temperatura se expresan mediante el siguiente modelo:

$$G_m = k_g \left(C_m - C_m^*\right)^g = k_{g,0} \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)\left(C_m - C_m^*\right)^g$$

o bien como:

$$G = G_m \left(\frac{\phi_A}{3\phi_V \rho_p}\right)$$

En el cambio de unidades de las concentraciones se puede utilizar la ecuación siguiente:

$$C_m = \frac{\dfrac{M_p C}{\rho_s}}{\left(1 - \dfrac{M_p\ C}{\rho_p}\right)}$$

Los valores de las variables y parámetros del sistema son las siguientes:

Parámetro o variable	**Valor y/o unidades**
B	$1/\left(\mathrm{m}^3 - \mathrm{s}\right)$
C (conc. fase líquida)	mol soluto/L solución
C^* (solubilidad)	mol soluto/L solución
C_s (conc. fase sólida)	mol soluto/L solución
C_m	masa soluto/masa solvente
C_m^*	masa soluto/masa solvente
$C_{m,0} = M_{o\ \text{soluto}}/M_{o\ \text{solvente}}$	$(0.125\ \mathrm{kg})\,/\,(0.263\ \mathrm{kg}) = 0.475\ \mathrm{kg/kg}$
E_a (energía de activación)	41.6 kJ/mol
G_m	$\mathrm{kg}/\left(\mathrm{m}^2 - \mathrm{s}\right)$
G	m/s
g	2
k_b	$3.96 \times 10^{24}\ 1/\mathrm{m}^3{-}\mathrm{s}$
k_B constante de Boltzmann	$1.38 \times 10^{-23}\ \mathrm{J/°K}$
$k_{g,0}$	$2.68 \times 10^4\ \mathrm{kg}/\left(\mathrm{m}^2 - \mathrm{s} - (\mathrm{kg/kg\ solvente})^g\right)$
M_p soluto	151.16 g/mol
n	$1/\left(\mathrm{m} - m^3\right)$
N_A	$6.02 \times 10^{23}/\,\mathrm{mol}$
R	$8.314\ \mathrm{J/(°K - mol)}$
T	°K
Ve	$0.10\ ^o\mathrm{C/min.}$
γ	$\mathrm{J/m}^2$
ρ_p soluto	$1293\ \mathrm{kg/m}^3$
ρ_s solvente	$789\ \mathrm{kg/m}^3$
ϕ_A octaedros	$\sqrt{3}\,(\sqrt[3]{\pi})^2 = 3.7153$
ϕ_V octaedros	$\sqrt{3}/2$

Se pide:

a) Establecer el balance de la densidad poblacional en el cristalizador.

b) Desarrollar el balance de masa de soluto en el cristalizador.

c) Discretizar la ecuación del balance de la densidad poblacional empleando el método de diferencias finitas de Runge-Kutta de primer orden.

d) Discretizar la ecuación del balance de soluto empleando el método de diferencias finitas de Runge-Kutta de primer orden.

e) Desarrollar un programa MATLAB para resolver el sistema de ecuaciones acopladas y graficar la curva de densidad poblacional a intervalos de 15 min cuando la cristalización se opera por espacio de 10 h.

Solución:

a) El balance de cristales en ausencia de rompimiento y aglomeración de cristales puede ser expresado como:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + G\frac{\partial n}{\partial l} = 0$$

En ausencia de cristales sembrados, la condición inicial de la ecuación anterior es:

$$t = 0 \qquad n = 0 \qquad \forall \ l$$

La condición de frontera se expresa como:

$$l = 0 \qquad n^0 = \frac{B}{G} \qquad \forall \ t$$

b) El balance de masa de soluto es el siguiente:

$$\frac{dC}{dt} = -\left(\frac{\rho_p}{M_p}\right)\phi_A G \int\limits_0^\infty nl^2 dl$$

La condición inicial de la ecuación anterior es:

$$t = 0 \qquad C = C_0$$

c) El balance poblacional en forma discreta es:

$$\frac{n\left(l_j, t_{i+1}\right) - n\left(l_j, t_i\right)}{\Delta t} + G(t_i)\frac{n\left(l_j, t_i\right) - n\left(l_{j-1}, t_i\right)}{\Delta l_j}$$

de tal manera que:

$$n\left(l_j, t_{i+1}\right) = n\left(l_j, t_i\right) - \left\{[G(t_i)]\left[\frac{n\left(l_j, t_i\right) - n\left(l_{j-1}, t_i\right)}{\Delta l_j}\right]\right\}\Delta t$$

d) El balance de soluto en forma discretizada se expresa como:

$$\frac{C\left(t_{i+1}\right) - C\left(t_i\right)}{\Delta t} = -\left(\frac{\rho_p}{M_p}\right)\phi_A G(t_i)\left(\sum_{j=1}^{\infty} n\left(l_j, t_i\right) l_j^2 \Delta l\right)$$

o bien,

$$C\left(t_{i+1}\right) = C\left(t_i\right) - \left[\left(\frac{\rho_p}{M_p}\right) G(t_i)\phi_A \left(\sum_{j=1}^{\infty} n\left(l_j, t_i\right) l_j^2 \Delta l\right)\right]\Delta t$$

e) En la Fig.12.14 se presenta un programa MATLAB para la solución del modelo del cristalizador.

Las curvas de densidad poblacional se muestran en la Fig. 12.15

Figura 12.14: Programa MATLAB para la obtención de las curvas de densidad poblacional del Ejemplo 12.3.

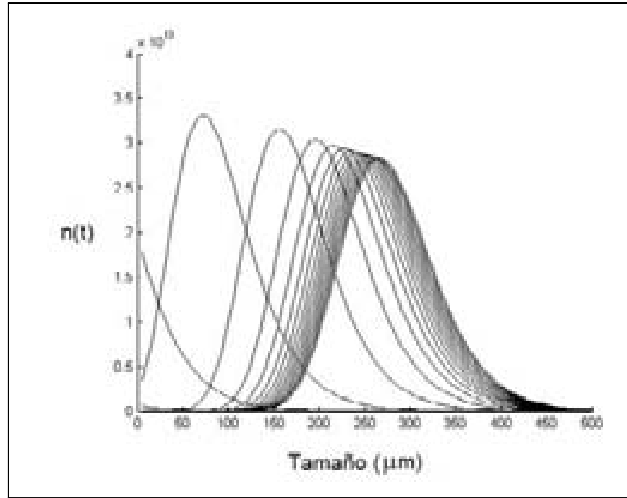


Figura 12.15: Curvas de distribución poblacional del Eejemplo 12.3.

Cristalización por lotes: enfriamiento controlado y con la nucleación suprimida

Los balances poblacionales para cristalizadores por lotes son más complejos debido a que tanto la velocidad de crecimiento de los cristales G, como la velocidad de nucleación B^o, son función de la sobresaturación que es variable en el proceso por lotes, disminuyendo continuamente desde su valor inicial hasta su valor al final del proceso. Por esta razón el enfoque de diseño utilizado en los cristalizadores continuos es poco útil para los cristalizadores por lotes.

En la cristalización por lotes con enfriamiento controlado, inicialmente la generación de sobresaturación por enfriamiento es lenta debido a que los cristales son aún pequeños. Conforme aumenta el área de los cristales la velocidad de generación de sobresaturación por enfriamiento también se aumenta.

En los cristalizadores con control de temperatura se ha utilizado un enfoque empírico para determinar la curva de enfriamiento del sistema (la variación de la temperatura con el tiempo dentro del cristalizador) debido a que es dificil establecer la cinética del sistema. Esta curva es empleada para diseñar el sistema de control.

En el enfoque empírico se supone que al inicio de la cristalización todos los cristales tienen el mismo tamaño y se busca determinar la dinámica que debe seguir la temperatura para mantener una velocidad de crecimiento constante. Con este propósito es necesario realizar un balance de la cantidad de soluto de sobresaturación dentro del cristalizador, el cual puede ser descrito en palabras como:

[La variación de la masa de soluto de sobresaturación] =

[La variación de la masa de soluto de sobresaturación por efecto de la temperatura] +

[La velocidad de consumo de soluto por crecimiento del cristal] +

[La velocidad de consumo de soluto por nucleación]

Las cristalizaciones por lotes generalmente se desarrollan en la región metaestable para controlar el tamaño del cristal minimizando la nucleación. Esto requiere que los cristales sean sembrados para iniciar el crecimiento. En este caso la variación de la masa de soluto de sobresaturación y el consumo de masa por nucleación pueden ser despreciados, simplificándose el balance anterior a los dos primeros términos del lado derecho. Este balance puede ser expresado con ayuda de las ecuaciones (12.5) y (12.6) de la siguiente forma:

$$0 = V\frac{dc^*}{dt} + \frac{A_T}{\left(\dfrac{1}{k_L} + \dfrac{1}{k_S}\right)}(c - c^*) \tag{12.23}$$

donde A_T es el área de todos los cristales, variable que depende de la velocidad de crecimiento, por lo tanto,

$$A_T = (\text{número de cristales})\left(\frac{\text{área}}{\text{cristal}}\right) \tag{12.24}$$

$$A_T = \left(\frac{M_S}{\rho_c \phi_V l_s^3}\right)\left[\phi_A (l_s + Gt)^2\right] \tag{12.25}$$

donde:

M_S: Masa total de los cristales sembrados.

l_s: Longitud de los cristales sembrados.

En la ecuación (12.25) G es la velocidad lineal de crecimiento del cristal dada por la ecuación (12.11), es decir;

$$G = \frac{dl}{dt} = \left\{\left[\frac{1}{\rho_c\left(\dfrac{1}{k_L} + \dfrac{1}{k_S}\right)}\right]\left(\frac{\phi_A}{3\phi_V}\right)\right\}(c - c^*) \tag{12.26}$$

sustituyendo las ecuaciones (12.25) y (12.26) en la ecuación (12.23):

$$\frac{dc^*}{dt} = -\left(\frac{M_s}{V}\right)\left(\frac{3G}{l_s^3}\right)(l_s + Gt)^2 \tag{12.27}$$

Dado que c^* es función de la temperatura,

$$\frac{dc^*}{dt} = \left(\frac{dc^*}{dT}\right)\left(\frac{dT}{dt}\right) \tag{12.28}$$

combinando (12.27) y (12.28),

$$\frac{dT}{dt} = -\left(\frac{\frac{M_s}{V}}{\frac{dc^*}{dT}}\right)\left(\frac{3G}{l_s^3}\right)(l_s + Gt)^2 \tag{12.29}$$

La ecuación anterior permite obtener la variación de temperatura para mantener una velocidad de crecimiento de cristales constante. Esta expresión puede simplificarse si se considera un intervalo corto de temperatura donde la variación de la solubilidad sea constante; en este caso la ecuación (12.29) puede ser integrada para obtener:

$$T = T_o - \left(\frac{\frac{M_s}{V}}{\frac{dc^*}{dT}}\right)\left(\frac{3Gt}{l_s}\right)\left[1 + \frac{Gt}{l_s} + \frac{1}{3}\left(\frac{Gt}{l_s}\right)^2\right] \tag{12.30}$$

donde T_o es la temperatura a la cual los cristales inician su crecimiento.

La ecuación anterior puede expresarse adimensionalmente utilizando la expresión de la longitud final del cristal,

$$l_f = l_s + Gt_f \tag{12.31}$$

donde t_f es el tiempo necesario para alcanzar l_f. A partir de la ecuación (12.31) se define un tiempo adimensional τ dado por:

$$\tau = \frac{Gt}{(l_f - l_s)} \tag{12.32}$$

y se define una longitud adimensional η que caracteriza las veces que se incrementa la longitud del cristal respecto a su tamaño inicial dada por:

$$\eta = \frac{(l_f - l_s)}{l_s} \tag{12.33}$$

sustituyendo (12.32) y (12.33) en (12.30) se obtiene:

$$T = T_o - \left(\frac{\frac{M_s}{V}}{\frac{dc^*}{dT}}\right)(3\eta\tau)\left[1 + \eta\tau + \frac{1}{3}(\eta\tau)^2\right] \tag{12.34}$$

De acuerdo a la ecuación (12.34) la masa final de los cristales menos la masa sembrada de los cristales está dada por:

$$M_f = V\left(\frac{dc^*}{dT}\right)(T_o - T_f) \tag{12.35}$$

combinando las expresiones (12.34) y (12.35) se obtiene la expresión adimensional:

$$\frac{T - T_o}{T_f - T_o} = \left(\frac{M_s}{M_f}\right)(3\eta\tau)\left[1 + \eta\tau + \frac{1}{3}(\eta\tau)^2\right] \tag{12.36}$$

Suponiendo que la densidad de cristales ρ_c permanece constante se puede derivar la siguiente expresión:

$$\frac{M_s}{M_f} = \left(\frac{l_s}{l_f}\right)^3 \tag{12.37}$$

la cual puede ser simplificada para l_s bajos, de acuerdo a la ecuación (12.33) como:

$$\frac{M_s}{M_f} \sim \frac{1}{\eta^3} \tag{12.38}$$

y la ecuación (12.36) se puede aproximar a:

$$\frac{T_o - T}{T_o - T_f} \doteq \tau^3 \tag{12.39}$$

que es la expresión de la curva de enfriamiento que permite mantener un crecimiento constante y evitar la nucleación inicial excesiva.

Ejemplo 12.4. Cristalización por lotes de ácido succínico.
Se pide: Obtener la curva de enfriamiento para ácido succínico en el intervalo de enfriamiento de 30 a 20 °C y un tiempo de operación de 120 min.
Solución:
Utilizando la ecuación (12.39),

$$\begin{aligned} \frac{(30 - T)}{(30 - 20)} &= \left(\frac{t}{120}\right)^3 \\ T &= 30 - \frac{10\ t^3}{(120)^3} \end{aligned}$$

En la Figura 12.16 se presenta la curva de enfriamiento que genera la expresión anterior. Inicialmente la temperatura permanece constante luego baja abruptamente. Este comportamiento es característico de la cristalización por lotes con control de temperatura (Qiu y Rasmuson, 1991).

Escalamiento de cristalizadores por lotes

Para realizar el escalamiento de cristalizadores por lotes se requiere desarrollar una expresión de la velocidad de nucleación como función de la velocidad de enfriamiento, de la agitación y de la geometría del cristalizador.

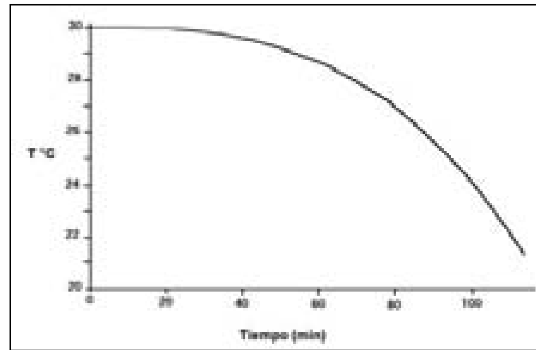


Figura 12.16: Curva de enfriamiento del Ejemplo 12.4.

Dado que generalmente el mecanismo de nucleación controlante a escala industrial es la nucleación secundaria, varios criterios de escalamiento se fundamentan en los aspectos de mezclado. Estos criterios plantean mantener constante entre las escalas algunos parámetros como: a) la potencia por unidad de volumen, b) la agitación, c) la velocidad de punta del agitador y d) la velocidad mínima del agitador que permita mantener la suspensión.

12.4.2. Cristalizador Continuo

La descripción de la cristalización continua también se realiza mediante balances poblacionales de cristales. La Figura 12.17 muestra el esquema de un cristalizador continuo perfectamente agitado operando en modo "cristalización por enfriamiento".

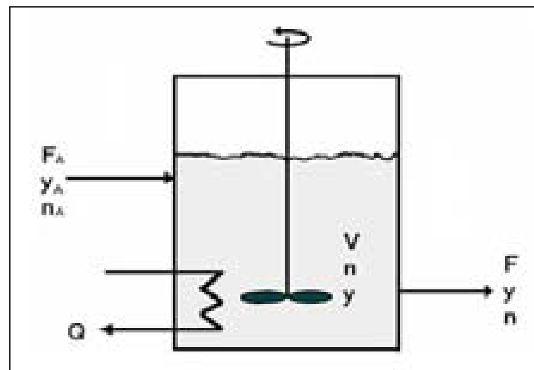


Figura 12.17: Esquema de un cristalizador continuo.

El cristalizador es alimentado continuamente con un flujo volumétrico de

solvente F_A que presenta una concentración y_A de soluto disuelto por volumen de solvente. La distribución del tamaño de los cristales a la entrada está dada por n_A.

El cristalizador contiene un volumen V de solvente, con una concentración de soluto disuelto por volumen de solvente y y una distribución de tamaño de cristales caracterizada como n. Como el cristalizador está perfectamente agitado el flujo volumétrico de solvente a la salida F también está caracterizado por y y n. El balance poblacional del cristalizador continuo está dado por la ecuación (12.20).

Cristalizador continuo con remoción de producto mezclado - Suspensión mezclada. (RPMSM)

La ecuación (12.20) ha sido resuelta para un caso particular de cristalizador continuo bien agitado llamado: Remoción de Producto Mezclado - Suspensión Mezclada (RPMSM), que está sujeto a las siguientes restricciones (Wierzbowska *et al.*, 2008):

a) El volumen es constante.

b) El cristalizador está perfectamente agitado y no existen pérdidas de solvente.

c) No existe variación del número de cristales por aglomeración o rompimiento.

d) El cristalizador opera en estado estacionario, por lo que:

$$\frac{\partial}{\partial t}(Vn) = 0 \tag{12.40}$$

e) La alimentación no contiene cristales,

$$n_A = 0 \tag{12.41}$$

f) El crecimiento de cristales al interior del cristalizador sigue la ley de Δl, es decir,

$$\frac{\partial G}{\partial l} = 0 \tag{12.42}$$

con base a lo anterior, el último término de la ecuación (12.20) puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{\partial (nG)}{\partial l} = n\frac{\partial G}{\partial l} + G\frac{\partial n}{\partial l} = G\frac{\partial n}{\partial l} \tag{12.43}$$

Considerando las ecuaciones (12.40) - (12.43), la ecuación (12.20) se simplifica a la forma siguiente:

$$G\frac{dn}{dl} + \frac{nF}{V} = 0 \tag{12.44}$$

como el tiempo de residencia promedio en el cristalizador está dado por:

$$\tau = \frac{V}{F} \tag{12.45}$$

entonces la ecuación (12.44) puede ser expresada como:

$$G\frac{dn}{dl} + \frac{n}{\tau} = 0 \tag{12.46}$$

Cuando l es muy pequeña (tiende a cero) la densidad poblacional $n(0)$ se deriva preferentemente de la nucleación de nuevos cristales, entonces,

$$n(0) = n^o = \frac{\frac{dN}{dt}}{\frac{dl}{dt}} = \frac{B^o}{G} \tag{12.47}$$

La ecuación (12.47) puede utilizarse como condición de frontera para la integración de la ecuación (12.46), obteniéndose la ecuación:

$$n = n^o \exp\left(\frac{-l}{G\tau}\right) \tag{12.48}$$

o bien,

$$n = \frac{B^o}{G} \exp\left(\frac{-l}{G\tau}\right) \tag{12.49}$$

La ecuación (12.49) puede ser utilizada para: a) estimación de parámetros en un cristalizador RPMSM y b) diseño de cristalizadores RPMSM.

Estimación de parámetros en un cristalizador RPMSM

La ecuación (12.49) puede ser utilizada para obtener velocidades de nucleación y crecimiento de cristales, mediante datos de densidad poblacional obtenidos en un cristalizador RPMSM. Para tal efecto, la ecuación (12.49) puede rearreglarse para ser expresarse en forma logarítmica como:

$$\ln(n) = \ln\left(\frac{B^o}{G}\right) - \frac{l}{G\tau} \tag{12.50}$$

De acuerdo con la ecuación anterior los datos experimentales de $\ln(n)$ vs l ajustados a una línea recta, presentarán una pendiente $m = (-1/G\tau)$ y una ordenada en el origen igual a $\ln(B^o/G)$.

El tiempo de residencia en el cristalizador y la pendiente permiten determinar G. La ordenada en el origen conjuntamente con el valor de G permiten determinar B^o.

Existen varias técnicas para obtener la distribución de tamaño de partículas de una población. Los procedimientos para determinar n a partir de los datos que se generan con las técnicas, varían con cada una de ellas. Dos técnicas son de particular interés: a) el analizador electrónico de partículas y b) el analizador de malla.

Analizadores electrónicos de partículas Los analizadores electrónicos de partículas miden el cambio de alguna propiedad como difracción de la luz, dispersión de la luz, bloqueo de luz, conductividad eléctrica o reflectancia, conforme la población de partículas fluye por un sensor (Barthe y Rousseau, 2006). El cambio de tales propiedades es función del volumen de la partícula, de tal manera que éste es el parámetro que se correlaciona con las mediciones del instrumento. Mediante estas determinaciones es posible obtener densidades poblacionales en forma directa o indirecta, dependiendo del equipo.

Analizador de mallas Los analizadores de mallas consisten en un conjunto de cilindros cortos sin tapa superior y con una malla en el fondo, arreglados verticalmente de mayor a menor tamaño de malla. Una vez que se coloca la muestra en el cilindro superior, el sistema se somete a movimiento mecánico, de tal manera que se genere un fenómeno de cribado. Funcionan en seco o en húmedo y proporcionan una distribución acumulativa de peso. Los cristales del magma bajo estudio requieren cierto tratamiento previo: deben ser filtrados, lavados, secados y durante su manejo debe evitarse su rompimiento.

Una vez que se ha cribado la muestra es necesario determinar n a partir de los datos de la masa de cristales acumulada en cada malla, lo cual puede realizarse de acuerdo a la ecuación (12.14) mediante la siguiente expresión:

$$n = \frac{M_T \Delta W}{\Delta l \rho_c \phi_V l^3} \tag{12.51}$$

donde:

M_T: Densidad de cristales en el magma (masa de cristales por unidad de volumen de solvente en la suspensión).

ΔW: Fracción de la masa total de cristales retenida en una malla.

l: Longitud de la abertura de la malla.

Δl: Intervalo de abertura de malla donde se retienen los cristales.

ρ_c: Densidad de los cristales.

ϕ_V: Factor geométrico de volumen.

El numerador de la ecuación (12.51) representa la masa de cristales de tamaño promedio l. El denominador contempla la masa de un cristal de tamaño promedio l y el intervalo Δl.

Ejemplo 12.5. Análisis de la cristalización de urea. Se obtiene una muestra de cristales de urea en un cristalizador RPMSM. La masa de cristales en la suspensión es de 450 g/L, la densidad de la urea es de 1.335 g/cm^3 y el tiempo de residencia de 3.38 h. El factor geométrico de volumen ϕ_V puede considerarse igual a la unidad.

En la Tabla 12.1 se presentan los datos del análisis de mallas practicado a la muestra. En la columna (1) el tamaño nominal de la malla, en la columna (2) el porcentaje de masa acumulada en la malla respectiva, en la columna (3) la fracción masa acumulada entre mallas y en la columna (4) la abertura de la malla en mm.

Tabla 12.1: Datos y cálculos del Ejemplo 12.5.

(1) Malla	(2) % de masa acumulada	(3) Frac. masa ΔW	(4) Tamaño abertura malla (mm)	(5) Longitud promedio $\bar{l}$ (mm)	(6) Incremento Δl (mm)	(7) n	(8) $\ln(n)$
14			1.190				
		0.044		1.016	0.349	40,581	10.61
20	4.4		0.841				
		0.144		0.718	0.246	533,070	13.19
28	14.4		0.595				
		0.242		0.508	0.175	3,566,200	15.09
35	24.2		0.420				
		0.316		0.359	0.123	18,795,000	16.75
48	31.6		0.297				
		0.155		0.254	0.087	36,865,000	17.42
65	15.5		0.210				
		0.074		0.180	0.061	70,703,000	18.07
100	7.4		0.149				
		0.025					
Fondo	2.5						

Fuente: Bennett, 1973.

Se pide: Calcular la velocidad de nucleación y crecimiento de los cristales de urea.

Solución:

De acuerdo con la ecuación (12.50) es necesario generar una gráfica de $\ln(n)$ vs l, para lo cual es necesario utilizar la ecuación (12.51).

Entre la malla 14 y la malla 20 los cálculos a realizar son:

$$\begin{aligned} \Delta l &= 1.190 \text{ mm} - 0.841 \text{ mm} = 0.349 \text{ mm} \\ \bar{l} &= \frac{(1.190 \ + 0.841) \text{ mm}}{2} = 1.016 \text{ mm} \end{aligned}$$

de tal manera que mediante la ecuación (12.51) se obtiene:

$$
\begin{aligned}
n_{20} &= \frac{450\ \dfrac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.044}{0.349\ \text{mm} \times 1.335\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times 1 \times 1.016\ \text{mm}^3 \times \dfrac{\text{cm}^3}{10^3\ \text{mm}^3}} \\
n_{20} &= 40,521\ \frac{\text{número de cristales}}{\text{mm} - \text{L}} \\
\ln(n_{20}) &= 10.61
\end{aligned}
$$

Los cálculos para las otras mallas aparecen en la Tabla 12.1 en las columnas (5), (6), (7) y (8).

Los datos de $\ln(n)$ vs l se presentan en la forma gráfica en la Figura 12.18. Los parámetros de la recta ajustada son:

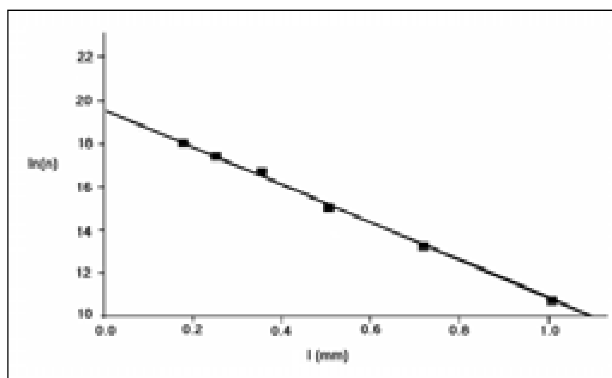


Figura 12.18: Curva de cristalización de urea del Ejemplo 12.5.

$$
\begin{aligned}
\text{Pendiente} &= -9.05\ \text{mm}^{-1} \\
\text{Ordenada en el origen} &= 19.765
\end{aligned}
$$

Con estos datos es posible calcular la velocidad de crecimiento y nucleación de los cristales.

a) Velocidad de crecimiento. De acuerdo a la ecuación (12.50),

$$m = -\frac{1}{G\tau}$$

de tal manera que:

$$G = -\frac{1}{\dfrac{-9.05}{\text{mm}} \times 3.38\ \text{h}} = 0.0327\ \frac{\text{mm}}{\text{h}}$$

b) Velocidad de nucleación. De acuerdo a la ecuación (12.47),

$$B^o = n^o G$$

como:

$$\ln(n^o) = 19.765$$

entonces,

$$n^o = 3.838 \times 10^8 \ \frac{\text{número de cristales}}{\text{mm} - \text{L}}$$

y la velocidad de nucleación es:

$$B^o = \left(3.838 \times 10^8 \ \frac{\text{número}}{\text{mm} - \text{L}}\right)\left(0.0327 \ \frac{\text{mm}}{\text{h}}\right) = 1.255 \times 10^7 \ \frac{\text{número}}{\text{L} - \text{h}}$$

Ejemplo 12.6. Orden de nucleación. Combinando estudios de laboratorio y estudios piloto, se obtuvieron valores de la velocidad de crecimiento y nucleación mediante análisis con mallas a diferentes tiempos de residencia, manteniendo la masa total de cristales por unidad de volumen constante e igual a 0.84 g/cm^3. La densidad de los cristales es de 1.23 g/cm^3 y el factor geométrico de volumen $\phi_V = 1$. La cinética de crecimiento de los cristales se puede considerar de primer orden ($g = 1$).

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 12.2.

Tabla 12.2: Datos del Ejemplo 12.6.

Corrida	τ (min)	G $\left(\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}\right)$	B^o $\left(\frac{\text{núm.}}{\text{cm}^3-\text{min}}\right)$
1	315	0.092	13,993
2	630	0.042	9,960
3	1,260	0.019	6,729
Fuente: Moyers y Rousseau, 1987.			

Se pide: Derivar una expresión de la variación de la velocidad de nucleación con la velocidad de crecimiento.

Solución:

De acuerdo con las ecuaciones (12.4) y (12.13),

$$
\begin{aligned}
B^o &= k_n(c - c^*)^i \\
G &= k_g(c - c^*)
\end{aligned}
$$

combinando estas expresiones se obtiene

$$B^o = k_N\,(G)^i \tag{12.52}$$

donde:

$$k_N = \frac{k_n}{(k_g)^i}$$

La expresión obtenida en forma logarítmica se expresa como:

$$\ln(B^o) = \ln(k_N) + i\ln(G)$$

de tal manera que los datos de $\ln(B^o)$ vs $\ln(G)$ se pueden ajustar a una recta de pendiente i y ordenada en el origen $\ln(k_N)$.

En la Figura 12.19 se presenta la gráfica correspondiente a los datos de la Tabla 12.2, de la cual se obtiene:

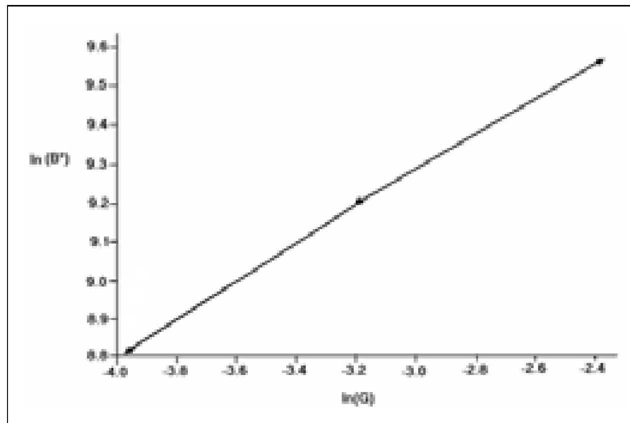


Figura 12.19: Determinación del orden de nucleación del Ejemplo 12.6.

$$i = 0.46\ ; \quad \ln(k_N) = 10.66$$

de tal manera que,

$$B^o = 42,699(G)^{0.46} \quad \left[\frac{\text{número}}{\text{cm}^3 - \text{min}}\right]$$

El valor de 0.46 indica una dependencia moderada de la velocidad de nucleación respecto a G (o a la sobresaturación). Esto es característico de moléculas grandes e indica que el mecanismo de nucleación no es muy sensible a la sobresaturación y que la nucleación secundaria es la dominante.

Dado que i es específico del sistema, se supone que este valor no cambia con la escala y puede determinarse mediante experimentos de laboratorio (cristalizador de 4 a 8 L).

El parámetro k_N es necesario determinarlo en una corrida a nivel piloto o a escala real, ya que es dependiente de la escala. Esto se realiza efectuando un análisis de mallas a la escala de interés para obtener G y B^o. Con estos valores y la i determinada en el laboratorio se obtiene k_N mediante la ecuación (12.52).

Diseño de cristalizadores RPMSM

En un RPMSM el tiempo de residencia τ es constante y la relación B^o/G también es constante, de tal manera que la densidad poblacional dada por la ecuación (12.48) está completamente determinada cuando se fijan las condiciones de operación.

Varias características de diseño de un cristalizador se derivan del uso de la distribución poblacional dada por la ecuación (12.48) y de los parámetros G y B^o que se obtienen mediante experimentación, entre las que se encuentran: a) los momentos, b) el tamaño de cristal dominante, c) el coeficiente de variación y d) la densidad del magma.

Momentos Contando con la expresión de la densidad poblacional y utilizando las expresiones de momentos, se pueden determinan los momentos 0, 1, 2 y 3 de la población de cristales. A continuación se ejemplifica lo anterior mediante el cálculo del momento 0.

Momento Cero: Fracción del número total de cristales de tamaño entre 0 y l. De acuerdo a la ecuación (12.16) y la ecuación (12.48) el número total de cristales por unidad de volumen está dado por la expresión:

$$N_T = \int_o^\infty n^o \ \exp\left(\frac{-l}{G\tau}\right) dl$$

la cual puede resolverse para obtener,

$$N_T = n^o G\tau \tag{12.53}$$

El número de cristales por unidad de volumen de tamaño entre 0 y l es:

$$
\begin{aligned}
N_l &= \int_o^l n^o \exp\left(\frac{-l}{G\tau}\right) dl \\
N_l &= n^o G\tau \left[1 - \exp\left(\frac{-l}{G\tau}\right)\right] \qquad (12.54)
\end{aligned}
$$

de tal manera que la fracción del total de la población es:

$$
\text{fracción} = \frac{n^o G\tau \left[1 - \exp\left(\frac{-l}{G\tau}\right)\right]}{n^o G\tau} = 1 - \exp(-X) \qquad (12.55)
$$

donde X es una longitud adimensional dada por:

$$
X = \frac{-l}{G\tau}
$$

Empleando un procedimiento similar al anterior se pueden obtener los otros momentos. En la Tabla 12.3 se presentan las expresiones de los momentos restantes.

Tabla 12.3: Momentos de un cristalizador RPMSM ($X = l/G\tau$).

Momento	Significado	Total	Fracción
0	número de cristales	$n^o G\tau$	$1 - e^{-X}$
1	longitud de los cristales	$n^o (G\tau)^2$	$1 - (1 + X)\left(e^{-X}\right)$
2	área de los cristales	$2\phi_A n^o (G\tau)^3$	$1 - \left(1 + X + \frac{X^2}{2}\right)\left(e^{-X}\right)$
3	masa de los cristales	$6\phi_V \rho_c n^o (G\tau)^4$	$1 - \left(1 + X + \frac{X^2}{2} + \frac{X^3}{6}\right)\left(e^{-X}\right)$

Tamaño de cristal dominante La longitud de cristal a la cual la densidad de la masa de cristales es máxima se llama tamaño de cristal dominante l_D.

La masa de cristales por unidad de volumen de solvente en un rango de tamaño de los cristales está dada por:

$$
dM = \rho_c \phi_V l^3 n dl \qquad (12.56)
$$

de la Tabla 12.3 la masa total de cristales por unidad de volumen es:

$$
M_T = 6\phi_V \rho_c n^o (G\tau)^4 \qquad (12.57)
$$

combinando las dos expresiones anteriores se tiene:

$$\frac{dW}{dl} = \frac{l^3}{6(G\tau)^4}\frac{n}{n^o} \tag{12.58}$$

donde W es la fracción masa de cristales. Las ecuaciones (12.48) y la (12.58) conducen a:

$$\frac{dW}{dl} = \frac{l^3}{6(G\tau)^4}\exp\left(\frac{-l}{G\tau}\right) \tag{12.59}$$

La densidad de la masa de cristales máxima se obtiene derivando con respecto a l la ecuación (12.59) e igualando a 0, entonces se tiene:

$$l_D = 3G\tau \tag{12.60}$$

Este tamaño característico de los cristales l_D, frecuentemente es utilizado como base para el diseño de cristalizadores.

Coeficiente de variación. El coeficiente de variación es una medida de la dispersión de la densidad de masa alrededor del valor l_D y está dado por:

$$CV = \frac{(l_{16} - l_{84})}{2l_D} \tag{12.61}$$

En el caso de la distribución para el RPMSM este valor es aproximadamente del 50 %. Tal dispersión es muy amplia para ser aceptable para algunos productos cristalinos como el azúcar común.

Densidad del magma La masa de cristales por unidad de volumen de solvente M_T es función de los parámetros cinéticos n^o y G (Tabla 12.3). Esta propiedad puede ser medida independientemente de la distribución de tamaño de cristales. Debido a lo anterior M_T puede ser utilizada para corroborar velocidades de nucleación y crecimiento estimadas mediante análisis de mallas. Este procedimiento se muestra en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 12.7. Evaluación de G y B^o. En un cristalizador experimental la densidad medida de cristales en el magma es de 450 g/L. Los resultados de los análisis de mallas generan los valores de $G = 0.0327$ mm/h y $B^o = 1.255 \times 10^7$ número/L−h. (datos del Ejemplo 12.5). La densidad de los cristales es de $\rho_c = 1.335$ g/cm^3 y el tiempo de residencia es de 3.38 h.

Se pide: Comparar la densidad experimental del magma con la estimada a partir del análisis de mallas.

Solución:

De acuerdo a la Tabla 12.3,

$$M_T = 6\phi_V \rho_c n^o (G\tau)^4$$

o bien,

$$M_T = 6\phi_V \rho_c \frac{B^o}{G}(G\tau)^4$$

sustituyendo valores,

$$\begin{aligned} M_T &= 6 \times 1 \times \left(1.335\ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right) \times \left(\frac{\text{cm}^3}{10^3\ \text{mm}^3}\right) \times \left(\frac{1.255 \times 10^7\ \frac{\text{núm}}{\text{L}-\text{h}}}{0.0327\ \frac{\text{mm}}{\text{h}}}\right) \\ &\quad \times \left(0.0327\ \frac{\text{mm}}{\text{h}} \times 3.38\ \text{h}\right)^4 \qquad (12.62) \\ M_T &= 458\ \frac{\text{g}}{\text{L}} \end{aligned}$$

.

El valor experimental de $M_T = 450$ g/L y el calculado de $M_T = 458$ g/L sugieren consistencia de los datos.

El siguiente ejemplo muestra como una vez obtenidos los parámetros cinéticos, éstos pueden ser utilizados para caracterizar una cristalización.

Ejemplo 12.8. Cristalización de sulfato de amonio. Un cristalizador RPMSM de 100 L es alimentado a 50 L/h con una solución sobresaturada de sulfato de amonio. La suspensión de cristales es retirada a un flujo de 50 L/h. Los estudios cinéticos indican que la velocidad de nucleación $B^o = 1.88 \times 10^7$ núm/L$-$h y la velocidad de crecimiento $G = 0.056$ mm/h. Los cristales presentan una densidad $\rho_c = 1.769$ g/cm^3 y de acuerdo a su forma $\phi_V = 1$.

Se pide calcular:

a) El tamaño de cristal dominante.

b) El número de cristales con un tamaño menor o igual al tamaño dominante.

c) La fracción del número de cristales totales con un tamaño igual o menor que el tamaño dominante.

d) La densidad de la suspensión.

e) Predecir la fracción masa de cristales por tamaño (utilizar tamaños de mallas estándares).

Solución:

a) De acuerdo a la ecuación (12.60) el tamaño de cristal dominante es:

$$l_D = 3G\tau = (3)\left(0.056\ \frac{\text{mm}}{\text{h}}\right)\left(\frac{100\ \text{L}}{50\ \frac{\text{L}}{\text{h}}}\right) = 0.336\ \text{mm}$$

b) El número de cristales N de tamaño igual o menor a l_D es:

$$N = \int_o^{l_D} n dl$$

o bien

$$N = (\text{total de cristales})(\text{fracción en el rango})$$

de acuerdo a la Tabla 12.3,

$$\begin{aligned} N &= (n^o G\tau)\left(1 - e^{-X}\right) \\ \text{con} \quad n^o &= \frac{B^o}{G} \quad \text{y} \quad X = \frac{l_D}{G\tau} = 3 \\ N &= (B^o\tau)\left(1 - e^{-X}\right) \end{aligned}$$

sustituyendo valores,

$$N = \left(1.88 \times 10^7 \ \frac{\text{núm}}{\text{L} - \text{h}} \times \frac{100 \ \text{L}}{50 \ \frac{\text{L}}{\text{h}}}\right)\left(1 - e^{-3}\right) = 3.57 \times 10^7 \ \frac{\text{núm}}{\text{L}}$$

c) De acuerdo a la Tabla 12.3 la fracción de cristales de tamaño en el rango $0 \leq l \leq l_D$ es:

$$(1 - e^{-3}) = 0.95$$

d) De la Tabla 12.3 la densidad de la suspensión está dada por:

$$M_T = 6\phi_V \rho_c n^o (G\tau)^4$$

sustituyendo valores con $n^o = B^o/G$,

$$\begin{aligned} M_T &= (6) \times (1) \times \left(1.769 \ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right) \times \left(\frac{\text{cm}^3}{1000 \ \text{mm}^3}\right) \times \left(\frac{1.88 \times 10^7 \ \frac{\text{núm}}{\text{L} - \text{h}}}{0.056 \ \frac{\text{mm}}{\text{h}}}\right) \\ &\quad \times \left(0.056 \ \frac{\text{mm}}{\text{h}} \times \frac{100 \ \text{L}}{50 \ \frac{\text{L}}{\text{h}}}\right)^4 \\ M_T &= 560 \ \frac{\text{g}}{\text{L}} \end{aligned}$$

e) De acuerdo a la Tabla 12.3, la fracción masa de cristales con tamaño menor o igual a l es:

$$\text{Fracción masa} = 1 - \left(1 + X + \frac{X^2}{2} + \frac{X^3}{6}\right)\left(e^{-X}\right)$$

de tal manera que la fracción de masa retenida en la malla de tamaño l es

$$\text{Fracción masa retenida} = \left(1 + X + \frac{X^2}{2} + \frac{X^3}{6}\right)\left(e^{-X}\right)$$

En la Tabla 12.4 se presentan los resultados obtenidos al utilizar la expresión anterior.

Tabla 12.4: Resultados Ejemplo 12.8 inciso e).

Malla	Tamaño (mm)	$X = \frac{l}{G\tau}$	Masa retenida. %
20	0.841	7.51	5.4
28	0.595	5.31	22.3
35	0.420	3.75	48.3
48	0.297	2.65	72.6
100	0.149	1.33	95.4

12.4.3. Cristalizadores Continuos con Remoción Selectiva

En un cristalizador RPMSM el control de la distribución de tamaño de los cristales es muy limitada. Las velocidades de crecimiento y nucleación, están determinadas por las variables de operación y la geometría del cristalizador.

Los cristalizadores continuos pueden hacerse más flexibles mediante el uso de dispositivos para la remoción selectiva de cristales, lo cual altera el tiempo de residencia de los materiales que salen del cristalizador. La función de estos dispositivos puede visualizarse más fácilmente en términos de los modelos idealizados: a) de extracción de líquido, b) de remoción de finos y c) de remoción de gruesos.

Modelo de extracción de líquido

La extracción de líquido consiste en la remoción de líquido libre de cristales del cristalizador. Esto provoca un aumento de la densidad de cristales al interior del cristalizador y un aumento en el tiempo de residencia de éstos.

Modelo de remoción de finos

El objetivo principal en la remoción de finos es la remoción continua de cristales cuyo tamaño sea menor al especificado. Después de ser retirados los cristales se redisuelven y alimentan nuevamente al cristalizador. Esto permite obtener cristales de mayor tamaño.

Modelo de remoción de gruesos

La remoción de gruesos consiste en remover los cristales cuyo tamaño sea mayor al especificado.

Los efectos de cada dispositivo de remoción pueden ser descritos en términos de la función de densidad poblacional n.

Modelo combinado

En el caso de un modelo combinado de remoción ideal de finos y gruesos llamado modelo $R{-}Z$, los balances poblacionales conducen (Moyers y Rousseau, 1987) a las tres expresiones de intervalo siguientes:

1. Para $l \leq l_f$:

$$n = n^o \exp\left(\frac{Rl}{G\tau}\right) \tag{12.63}$$

2. Para $l_f \leq l \leq l_c$

$$n = n^o \exp\left(-\frac{(R-1)l_f}{G\tau}\right) \exp\left(-\frac{l}{G\tau}\right) \tag{12.64}$$

3. Para $l \geq l_c$

$$n = n^o \exp\left(-\frac{(R-1)l_f}{G\tau}\right) \exp\left(\frac{(Z-1)l_c}{G\tau}\right) \exp\left(-\frac{Zl}{G\tau}\right) \tag{12.65}$$

donde:

l_f: Tamaño mínimo aceptable de los cristales.

l_c: Tamaño máximo aceptable de los cristales.

R: Índice de remoción de finos.

Z: Índices de remoción de gruesos.

Cuando $R = 1$ no existe remoción de finos, cuando $Z = 1$ no existe remoción de gruesos. Un cristalizador con remoción tanto de finos como de gruesos, produce una distribución de cristales con tamaño de cristal dominante alto y bajo coeficiente de variación.

12.4.4. Balances de Masa y Energía en Cristalizadores Continuos

En la optimización de un proceso de separación es necesario calcular la eficiencia en la recuperación de producto como función de las variables de diseño. De acuerdo con la Figura 12.20 en un proceso de cristalización el rendimiento está dado por:

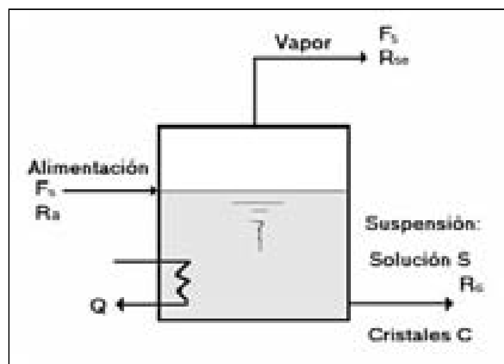


Figura 12.20: Esquema general de un cristalizador continuo.

$$\text{Rendimiento} = \frac{F_s R_a - S R_c}{F_s R_a} \tag{12.66}$$

donde:

F_s: Flujo másico de solvente en la alimentación. $[M/t]$.

R_a: Masa de soluto por masa de solvente en la alimentación. $[M/M]$.

S: Flujo másico de solvente en la suspensión de salida. $[M/t]$.

R_c: Masa de soluto disuelto por masa de solvente en la solución de salida. $[M/M]$.

R_{se}: Masa de solvente evaporada por masa de solvente alimentada. $[M/M]$.

C: Flujo másico de cristales en la suspensión de salida. $[M/t]$.

Modos de operación y control del rendimiento

El flujo de solvente F_s y la fracción masa libre de soluto R_a, generalmente se fijan por las operaciones previas a la cristalización. La fracción masa (libre de soluto) del soluto disuelto R_c, es la solubilidad del soluto en el solvente a la temperatura de operación. Por lo tanto, el rendimiento de una operación de cristalización puede ser controlado en cierto grado, mediante un control de

la temperatura o cambiando el tipo de solvente. Otra variable que puede ser controlada en una cristalización es el flujo másico de solvente a la salida S, mediante los diferentes modos de operación de los cristalizadores:

a) En los sistemas con evaporación, S disminuye debido a la corriente de vapor producido y el rendimiento se incrementa.

b) En el modo de enfriamiento adiabático la cantidad de vapor liberada está fijada por los balances de energía.

c) En los sistemas con evaporación o en los sistemas combinados de enfriamiento adiabático con evaporación, el diseñador puede controlar la presión para fijar la temperatura y por lo tanto R_c, así como administrar calor externo para controlar S, de tal manera que ambos efectos contribuyen a incrementar el rendimiento de la operación.

d) Cuando la cristalización es sólo por enfriamiento, el único control sobre el rendimiento es la temperatura.

La conclusión de la discusión anterior es que para una F_s y R_a dados, y una relación de solubilidad dada, el modo de la cristalización determina la recuperación máxima de soluto alcanzable.

Balances de masa

Para sistemas binarios es posible desarrollar expresiones para el rendimiento y las composiciones de las corrientes en función de: a) las condiciones de entrada, b) la cantidad de solvente evaporado y c) las condiciones dentro del cristalizador. A continuación se presenta este procedimiento.

De acuerdo a la Figura 12.20 el balance de masa total en el sistema está dado por:

$$F_s + F_s R_a = F_s R_{se} + S + C + S R_c \tag{12.67}$$

El balance de soluto está dado por:

$$F_s R_a = C + S R_c \tag{12.68}$$

y el balance de solvente por:

$$F_s = F_s R_{se} + S \tag{12.69}$$

Combinando las ecuaciones (12.67), (12.68) y (12.69) se obtiene la ecuación para el flujo de salida de solvente,

$$S = \frac{F_s(1 - R_{se}) + F_s(1 - R_{se})R_c}{1 + R_c} \tag{12.70}$$

Combinando las ecuaciones (12.68) y (12.69) se genera una ecuación para el flujo másico de cristales,

$$C = F_s[R_a - (1 - R_{se})R_c] \tag{12.71}$$

El rendimiento dado por la ecuación (12.66) puede también ser expresado como:

$$\text{Rendimiento} = \frac{C}{F_s R_a} \tag{12.72}$$

sustituyendo la ecuación (12.71) en la (12.72),

$$\text{Rendimiento} = \frac{R_a - R_c(1 - R_{se})}{R_a} \tag{12.73}$$

La ecuación (12.73) permite calcular el rendimiento mediante los datos de diseño R_a, de equilibrio R_c y de operación R_{se}.

La fracción masa de cristales en la suspensión de salida ST es:

$$ST = \frac{C}{F_s + F_s R_a - F_s R_{se}} \tag{12.74}$$

combinando (12.71) y (12.74) se obtiene:

$$ST = \frac{R_a - (1 - R_{se})R_c}{1 + R_a - R_{se}} \tag{12.75}$$

Balances de masa y modos de operación

Las ecuaciones (12.73) y (12.75) se simplifican para los modos de operación particulares que se describen a continuación.

Cristalización por enfriamiento indirecto En este caso no existe evaporación de solvente por lo que:

$$R_{se} = 0 \tag{12.76}$$

y las ecuaciones (12.73) y (12.75) se expresan como:

$$\text{Rendimiento} = \frac{R_a - R_c}{R_a} \tag{12.77}$$

$$ST = \frac{R_a - R_c}{1 + R_a} \tag{12.78}$$

Cristalización sólo por evaporación En este caso la fracción masa de soluto en la alimentación es igual a la fracción masa en la solución de salida,

$$R_a = R_c \tag{12.79}$$

y las ecuaciones (12.73) y (12.75) se expresan como:

$$\text{Rendimiento} = R_{se} \tag{12.80}$$

$$ST = \frac{R_a R_{se}}{1 + R_a - R_{se}} \tag{12.81}$$

Cristalización por evaporación adiabática sin reflujo En este caso a diferencia de los dos casos anteriores, además de los balances de masa se requiere efectuar un balance de energía para determinar la cantidad de solvente evaporado en el cristalizador.

Balance de energía Este balance puede ser expresado en palabras como:

[La velocidad de salida de calor por evaporación del solvente] =

[El calor liberado por la cristalización de enfriamiento] +

[Entrada convectiva de calor] +

[Calor liberado por cristalización por "salting out"]

La ecuación de balance de energía es la siguiente:

$$\begin{aligned} F_s R_{se} \lambda_v &= F_s (R_a - R_c) \lambda_f + F_s (1 + R_a) C_p \Delta T \\ &\quad + F_s R_c R_{se} \lambda_f \end{aligned} \tag{12.82}$$

donde:

ΔT: Temperatura de alimentación menos temperatura del cristalizador. [°].

C_p: Capacidad calorífica de la alimentación. [cal/M − °].

λ_v: Calor de evaporación del solvente. [cal/M].

λ_f: Calor de cristalización del soluto. [cal/M].

Con base a lo anterior las ecuaciones de diseño para cristalización con enfriamiento adiabático son:

$$R_{se} = \frac{\lambda_f (R_a - R_c) + C_p \Delta T (1 + R_a)}{\lambda_v - \lambda_f R_c} \tag{12.83}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{R_a - (1 - R_{se}) R_c}{R_a} \tag{12.84}$$

$$ST = \frac{R_a - (1 - R_{se}) R_c}{1 + R_c - R_{se}} \tag{12.85}$$

Las ecuaciones anteriores pueden ser resueltas si se conoce la concentración de soluto disuelto en la suspensión de salida R_c. Generalmente es aceptable suponer que esta concentración corresponde a la de saturación. Los sistemas en los cuales ésto ocurre se llaman sistema tipo II o de rápido crecimiento, en oposición a los sistemas tipo I donde la concentración de salida R_c es mayor que la de saturación debido al lento crecimiento en estos sistemas.

Ejemplo 12.9. Balances de masa y energía en un cristalizador adiabático.

Se desea analizar la variación del rendimiento y la concentración de sólidos en la corriente de salida, con la presión de operación de un cristalizador. En las columnas (1), (2) y (3) de la Tabla 12.5 se muestran los datos de equilibrio para el sistema a cuatro presiones absolutas diferentes.

La solución alimentada al cristalizador tiene una concentración $R_a = 0.379$ g de soluto/ g de solvente y se alimenta a una temperatura de 100 °C. El calor de vaporización del solvente es de $\lambda_v = 100$ cal/g, el calor de fusión del cristal es de $\lambda_f = 33.3$ cal/g y la capacidad calorífica de la solución de $C_p = 0.556$ cal/g−°.

Se pide: Calcular la fracción masa de cristales a la salida del cristalizador y el rendimiento a cada una de las presiones de operación.

Solución:

Considerando un sistema de cristalización tipo II, el flujo másico de evaporación adiabática de solvente puede calcularse utilizando la ecuación (12.83) y aparece en la columna (4) de la Tabla 12.5. El rendimiento y la fracción masa se calculan utilizando las ecuaciones (12.84) y (12.85), respectivamente. Estos valores aparecen en las columnas (5) y (6) de la Tabla 12.5.

Tanto la fracción masa de cristales como el rendimiento aumentan al disminuir la presión de operación.

Balances y cinética

En el diseño de un cristalizador es necesario combinar las expresiones de la cinética de la cristalización con los balances de masa y energía. El uso de la cinética de la cristalización para el análisis y diseño provee una nueva dimensión

Tabla 12.5: Datos y solución del Ejemplo 12.9.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Presión mm de Hg	T °C	R_c $\frac{\text{g soluto}}{\text{g solvente}}$	R_{se} $\frac{\text{g solv. evap.}}{\text{g solv. alim.}}$	Rend. $\frac{\text{g cristales}}{\text{g soluto alim.}}$	ST $\frac{\text{g cristales}}{\text{g totales}}$
160	65	0.100	0.374	0.835	0.316
135	60	0.072	0.419	0.890	0.347
90	50	0.043	0.502	0.944	0.400
60	40	0.028	0.582	0.969	0.453

Fuente: Moyers y Rousseau, 1987.

a las técnicas de diseño disponible. Contando con la cinética de la cristalización es posible evaluar la sensibilidad de la distribución de tamaño de cristales a los diferentes parámetros de operación como: a) tiempo de residencia, b) remoción de finos, c) remoción de gruesos, d) densidad de la suspensión, e) temperatura, f) sembrado y g) operación en serie.

Ejemplo 12.10. Diseño de un cristalizador continuo. Se desea diseñar un cristalizador para producir 455 kg/h de cristales de un compuesto. Los criterios de diseño son los siguientes:

a) 75 % de la masa de los cristales debe tener un tamaño mayor a 100 μm.

b) La fracción de masa de cristales ST a la salida debe ser de 0.5.

c) El rendimiento debe ser mayor a 0.95.

Los datos y condiciones de operación se presentan en la Tabla 12.6 y los datos de equilibrio se presentan en la Tabla 12.7.

Los estudios realizados a nivel laboratorio y a nivel piloto en un cristalizador RPMSM, manteniendo constante M_T en 0.84 g/cm^3 generaron la expresión cinética siguiente:

$$B^o = 42,699(G)^{0.46}$$

donde las unidades son:

$$B^o \left[\frac{\text{núm}}{cm^3 - min}\right]; \qquad G \quad \left[\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}\right]; \qquad k_N \quad \left[\frac{\dfrac{\text{núm}}{\text{cm}^3 - \text{min}}}{\left(\dfrac{\mu\text{m}}{\text{min}}\right)^{0.46}}\right]$$

Se pide: Diseñar el cristalizador.

Solución:

El diseño del cristalizador se efectúa mediante los siguientes pasos:

a) Elaboración de los balances de masa y energía.

Tabla 12.6: Datos y condiciones de operación del Ejemplo 12.10.

Composición alimentación	0.379 $\frac{\text{g soluto}}{\text{g solvente}}$
Temperatura alimentación	100 °C
Calor específico de la suspensión y solución	0.556 cal/g–°
Calor de evaporación del solvente	100 cal/g
Calor de cristalización	33.3 cal/g
Gravedad específica de los cristales	1.23
Gravedad específica del líquido	0.84
Factor volumétrico del cristal	1
Fuente: Moyers y Rousseau, 1987.	

Tabla 12.7: Datos de equilibrio del Ejemplo 12.10.

Presión mm Hg	T Cristalizador °C	R_c $\frac{\text{masa soluto}}{\text{masa solvente}}$
160	65	0.100
135	60	0.072
90	50	0.043
60	40	0.028
40	30	0.018

Fuente: Moyers y Rousseau, 1987.

b) Estudio cinético: efecto del tiempo de residencia, punto de corte de finos l_f y proporción de remoción de finos, sobre la distribución de tamaño de cristales.

c) Dimensionamiento y especificación de equipo.

Solución a) Balances de masa y energía.

Los datos de equilibrio de la Tabla 12.7 sugieren una alta sensibilidad de la solubilidad del soluto a la temperatura, de tal manera que es factible la cristalización por enfriamiento.

Considerando un sistema de cristalización tipo II y dos modos de cristalización: a) enfriamiento indirecto y b) enfriamiento adiabático, los cálculos de rendimiento y fracción masa de los cristales a la salida del cristalizador, se pueden realizar mediante las ecuaciones (12.77) y (12.78) para enfriamiento indirecto, y mediante las ecuaciones (12.83), (12.84) y (12.85) para enfriamiento adiabático. Los resultados correspondientes se presentan en la Tabla 12.8.

De acuerdo a los balances de la Tabla 12.8 el modo de cristalización por

Tabla 12.8: Balances de masa y energía para Ejemplo 12.10.

T °C	Enfriamiento Indirecto		Enfriamiento Adiabático	
	Rend.	ST	Rend.	ST
65	0.74	0.20	0.83	0.32
60	0.81	0.22	0.89	0.35
50	0.89	0.24	0.94	0.40
40	0.93	0.25	0.97	0.45
30	0.95	0.26	0.98	0.51

enfriamiento indirecto, no permite cumplir con la especificación de diseño que establece una fracción masa de cristales a la salida $ST = 0.5$, aún cuando se alcanza el rendimiento deseado.

El modo de operación de enfriamiento adiabático también alcanza el rendimiento deseado, pero ni aún a 40 °C (60 mm de Hg) satisface la condición de $ST = 0.5$.

Decisión 1. En base a lo anterior se selecciona el modo de operación adiabático al vacío con adición de calor externo para producir una solución más concentrada. Considerando la conveniencia de una temperatura de operación intermedia que permita operar el condesador sin el uso de un agente condensante refrigerado, se sugiere emplear una temperatura de operación de 50 °C, en un cristalizador con calentamiento externo. La presión de operación será entonces de 90 mm de Hg (Tabla 12.7).

Una vez tomada la decisión anterior se puede calcular R_{se} mediante la ecuación general (12.75),

$$ST = \frac{R_a - (1 - R_{se})R_c}{1 + R_a - R_{se}}$$

sustituyendo valores,

$$0.5 = \frac{0.379 - (1 - R_{se}) \times 0.043}{1 + 0.379 - R_{se}}$$

se obtiene:

$$R_{se} = 0.65$$

Este resultado indica que es necesario remover el 65 % del solvente que entra para cumplir con $ST = 0.5$.

El balance de masa del sistema de acuerdo a la Figura 12.21 puede desarrollarse de la siguiente manera:

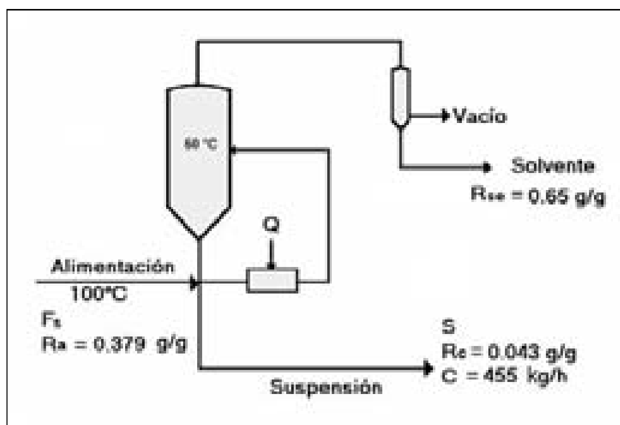


Figura 12.21: Diagrama de flujo Ejemplo 12.10.

En la corriente de salida,

$$0.5 = \frac{\text{masa de cristales}}{\text{masa total}} = \frac{455\ \dfrac{\text{kg}}{\text{h}}}{(S + SR_c) + 455\ \dfrac{\text{kg}}{\text{h}}}$$

como $R_c = 0.043$ (Tabla 12.7, $T = 50$ °C) entonces ,

$$\begin{aligned} S &= 436.24\ \frac{\text{kg de solvente}}{\text{h}} \\ SR_c &= 18.76\ \frac{\text{kg de soluto disuelto}}{\text{h}} \end{aligned}$$

El balance global de soluto es:

$$F_s R_a = C + SR_c$$

de tal manera que:

$$\begin{aligned} F_s &= \frac{(455\ + 18.76)\ \dfrac{\text{kg}}{\text{h}}}{0.379\ \dfrac{\text{kg}}{\text{kg}}} = 1250\ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \\ F_s R_a &= 473.76\ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \end{aligned}$$

El flujo de solvente evaporado es:

$$F_s R_{se} = 812.5 \ \frac{\text{kg}}{\text{h}}$$

El rendimiento de acuerdo a la ecuación general (12.73) es:

$$\text{Rendimiento} = \frac{R_a - (1 - R_{se})R_c}{R_a} = \frac{0.379 - (1 - 0.65) \times 0.043}{0.379} = 0.96$$

El balance de energía permite calcular el calor adicional necesario y se puede expresar en palabras como:

$$\left| \begin{array}{l} \text{Salida de calor por} \\ \text{evaporación del solvente} \end{array} \right| = \left| \begin{array}{l} \ \text{Calor liberado durante la cristalización} \\ + \text{ Entrada de calor por convección} \\ + \text{ Calor liberado por Salting-Out} \\ + \text{ Calor suministrado} \end{array} \right|$$

y en forma de ecuación como:

$$\begin{aligned} F_s R_{se} \lambda_v &= F_s (R_a - R_c) \lambda_f + F_s (1 + R_a) C_p \Delta T \\ &+ F_s R_c R_{se} \lambda_f + Q \end{aligned}$$

de tal manera que:

$$\begin{aligned} Q &= 1250 \ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \left\{ \left[0.65 \ \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \times 100 \ \frac{\text{cal}}{\text{g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{\text{kg}} \right] \right. \\ &- \left[(0.379 - 0.043) \ \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \times 33.3 \ \frac{\text{cal}}{\text{g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{\text{kg}} \right] \\ &- \left[\left(1 + 0.379 \ \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \right) \times 0.556 \ \frac{\text{cal}}{\text{g} - {}^\circ} \times \frac{1000 \text{ g}}{\text{kg}} \times (100 - 50) \ {}^\circ\text{C} \right] \\ &- \left. \left[0.043 \ \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \times 0.65 \ \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \times 33.3 \ \frac{\text{cal}}{\text{g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{\text{kg}} \right] \right\} \\ Q &= 1.818 \times 10^7 \ \frac{\text{cal}}{\text{h}} \end{aligned}$$

Los balances de masa y energía permiten determinar los requerimientos para cumplir con los dos criterios de diseño:

1) Rend. > 0.95 y 2) $ST = 0.5$

El problema de diseño restante consiste en determinar como cumplir con la distribución de tamaño de cristales.

Solución inciso b) Estudio Cinético.

El tamaño de cristal varía con tiempo de residencia y con el sistema de remoción de gruesos y finos. Para explorar la influencia del tiempo de residencia en el tamaño de cristal deseado, que de acuerdo al criterio de diseño al menos el 75 % de la masa de cristales debe tener un tamaño mayor a 100 μm, se pueden combinar las expresiones siguientes:

$$\begin{aligned} B^o &= k_N(G)^i \\ n^o &= \frac{B^o}{G} \\ M_T &= 6\phi_V \rho_c n^o (G\tau)^4 \end{aligned}$$

para obtener la siguiente ecuación que permite relacionar τ con G,

$$G = \left(\frac{M_T}{6\phi_V \rho_c k_N \tau^4} \right)^{\frac{1}{(i+3)}}$$

De acuerdo a los balances de masa, la masa de cristales por unidad de volumen de solvente en la suspensión está dada por:

$$\begin{aligned} M_T &= \frac{C}{\frac{(F_s - F_s \times R_{se})}{\rho_s}} \\ M_T &= \frac{455 \ \frac{\text{kg}}{\text{h}}}{\frac{[1250 - (1250 \times 0.65)] \ \frac{\text{kg}}{\text{h}}}{0.84 \ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}}} = 0.87 \ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \end{aligned}$$

La fracción masa de cristales menores a $l = 100$ μm (Tabla 12.3) está dada por:

$$\text{Frac. masa} = 1 - \left(1 + X + \frac{1}{2}X^2 + \frac{1}{6}X^3 \right) \left(e^{-X} \right)$$

Para $\tau = 107$ min,

$$\begin{aligned} G &= \left\{ \frac{\left(0.87 \ \times \frac{10^{12} \ \mu\text{m}^3}{\text{cm}^3} \right)}{6 \times 1.23 \ \times 42,699 \ \left(\frac{\text{núm}}{\text{cm}^3 - \text{min}} \right) \left(\frac{\text{min}}{\mu\text{m}} \right)^{0.46} \times (107 \text{ min})^4} \right\}^{\frac{1}{3.46}} \\ G &= 0.328 \ \frac{\mu\text{m}}{\text{min}} \end{aligned}$$

la longitud adimensional es:

$$X = \frac{100\ \mu\text{m}}{\left(0.328\ \dfrac{\mu\text{m}}{\text{min}} \times 107\ \text{min}\right)} = 2.85$$

La fracción de masa menor a 100 μm es:

$$\text{Frac. masa} = 1 - \left(1 + 2.85 + \frac{(2.85)^2}{2} + \frac{(2.85)^3}{6}\right)\left(e^{-2.85}\right) = 0.32$$

En la Tabla 12.9 se muestran los resultados del resto de los cálculos del efecto de la variación del tiempo de residencia sobre la velocidad de crecimiento, el parámetro X y la fracción masa de cristales de longitud menor a 100 μm.

Tabla 12.9: Efecto del tiempo de residencia sobre la fracción masa de cristales menor a 100 μm.

τ *min*	G μm/min	X *Adim*	*Frac. masa* $< 100\ \mu$m
107	0.328	2.8	0.32
315	0.094	3.4	0.44
630	0.042	3.8	0.52
1260	0.019	4.2	0.60
2520	0.009	4.7	0.68

De acuerdo a estos resultados el tamaño de los cristales disminuye al aumentar el tiempo de residencia. Esto se debe al mayor impacto de la sobresaturación sobre la velocidad de nucleación que sobre la velocidad de crecimiento.

Decisión 2. Se selecciona el tiempo de residencia de 315 min para continuar el diseño. Una disminución mayor del tiempo de residencia podría evitar el consumo de la sobresaturación, provocando que este sistema de tipo II se convirtiera en uno de tipo I.

Una vez analizado el impacto del tiempo de residencia sobre el tamaño de los cristales, se debe analizar el impacto del sistema de remoción de finos sobre ese parámetro de diseño.

Existen varias opciones para remoción de finos que se derivan de las posibles combinaciones entre el tamaño de corte l_f y el índice de remoción R. Es obvio que conforme l_f aumenta a R constante, la fracción de cristales menor a 100 μm disminuye. Así mismo, conforme R aumenta a l_f constante, la fracción de cristales menor a 100 μm también disminuye. Este comportamiento se muestra en la Figura 12.22. La figura también muestra tres combinaciones de l_f y R que permiten cumplir con la tercer condición de diseño que establece que el 75 % de la fracción masa de cristales tenga una longitud mayor a 100 μm.

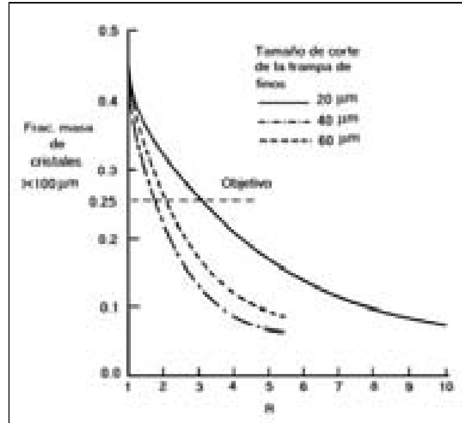


Figura 12.22: Sensibilidad del tamaño del producto al tamaño de corte de finos. Tomada de: Moyers y Rousseau, 1987.

Decisión 3. Una $R = 1.8$ y una $l_f = 60$ μm son seleccionadas para el diseño final.

Solución inciso c) Dimensionamiento

La masa de cristales en el interior del cristalizador se puede obtener a partir del flujo y el tiempo de residencia en el cristalizador, de tal manera que:

$$\text{Masa de cristales} = (315 \text{ min}) \left(\frac{\text{h}}{60 \text{ min}} \right) \left(455 \ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \right) = 2,388.75 \text{ kg}$$

La masa de la suspensión en el interior del cristalizador es:

$$\text{Masa de suspensión} = \frac{2388.75 \text{ kg}}{0.5 \ \frac{\text{kg}}{\text{kg}}} = 4,777.5 \text{ kg}$$

El volumen de la suspensión es:

$$
\begin{aligned}
V_{\text{susp.}} &= \frac{2388.75\ \text{kg}}{1.23\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times \dfrac{1000\ \text{cm}^3}{\text{L}} \times \dfrac{\text{kg}}{1000\ \text{g}}} \\
&+ \frac{2388.75\ \text{kg}}{0.84\ \dfrac{\text{g}}{\text{cm}^3} \times \dfrac{1000\ \text{cm}^3}{\text{L}} \times \dfrac{\text{kg}}{1000\ \text{g}}} \\
V_{\text{susp.}} &= 4,786\ \text{L} \\
\text{Productividad} &= \frac{455\ \dfrac{\text{kg}}{\text{h}}}{4,786\ \text{L}} = 0.095\ \frac{\text{kg}}{\text{L}-\text{h}}
\end{aligned}
$$

El área de la sección transversal del cristalizador deberá considerar el tamaño de corte de finos que se desea separar. La Figura 12.23 muestra el diseño conceptual del cristalizador.

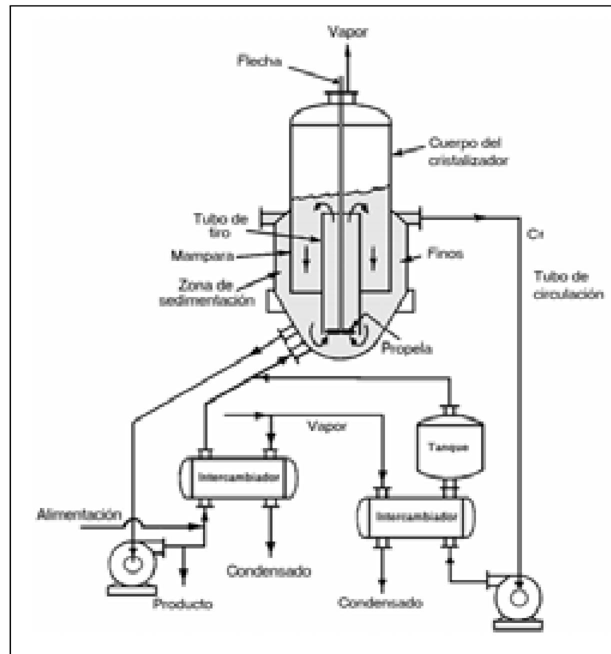


Figura 12.23: Diseño conceptual que satisface las condiciones de diseño del Ejemplo 12.10. Tomada de: Moyers y Rousseau, 1987.

12.5. Sumario

La cristalización es una operación de acabado ampliamente utilizada a nivel industrial que permite purificar un soluto mediante la formación de cristales. La fuerza impulsora de la cristalización es la sobresaturación de la solución. Existen varias formas para generar la sobresaturación en la solución de interés, las cuales se basan ya sea en el enfriamiento de la solución o en su calentamiento al vacío.

La sobresaturación que se logra en el cristalizador es la fuerza impulsora tanto de la nucleación (origen de los cristales) como de su crecimiento. Ambos fenómenos se asocian con la cinética de la cristalización.

Actualmente se han logrado avances importantes en la modelación de cristalizadores para su análisis, diseño y optimización, en aplicaciones a situaciones de importancia industrial.

12.6. Problemas

12.1. Cristalizador RPMSM. En el estudio cinético de la cristalización por enfriamiento de $Na_2SO_4 \cdot \dot{5}H_2O$ (Graber y Taboada, 1991) en un cristalizador RPMSM de forma cilíndrica de 15.2 cm de diámetro y 39 cm de altura, cuando el cristalizador operaba en estado estacionario, se obtuvo una muestra de cristales contenidos en 2.04 L de solvente, con las siguientes características:

Malla No.	**Tamaño de abertura de malla** (mm)	**Masa en la malla** (g)
16	1.180	9.12
18	1.000	32.12
20	0.850	39.82
30	0.600	235.42
40	0.425	89.14
50	0.300	54.42
70	0.212	22.02
100	0.150	7.22
140	0.106	1.22
Fondo		0.50

Los cristales tienen una densidad de 1.464 g/cm^3 y un factor geométrico de volumen de 0.553. El tiempo de residencia fue de 0.622 h.

Se pide calcular:

a) La masa total de cristales en la muestra.

b) La variación del número de cristales con el tamaño de cristal.

c) La velocidad de crecimiento de cristales.

d) La velocidad de nucleación de cristales.

e)La densidad experimental de cristales.

f) La densidad estimada de cristales.

Resp. a) 491 g, c) 0.322 mm/h , d) 1.045×10^7 num/L$-$h , e) 240.68 g/L y f) 253.8 g/L.

12.2. Cristalización por lotes. Se realiza una cristalización por lotes enfriando una solución de ácido cítrico de 60 a 40 °C. En esta región, la variación de la solubilidad de equilibrio del ácido cítrico es de 0.006 $g/cm^3 - {}^\circ C$ (Bohlin y Rasmuson, 1992).

Los cristales al sembrarse tienen una longitud característica inicial de 90 μm, con factores geométricos de área y volumen de 3.1 y 0.52, respectivamente. La densidad de los cristales es de 1.54 g/cm^3, la concentración de cristales sembrados de 7.7×10^{-5} g/cm^3 y el tamaño final del cristal fue de $1,000$ μm. La sobresaturación esperada durante la cristalización es de 0.2 g/cm^3. El crecimiento de los cristales está controlado por la difusión con un coeficiente de transferencia de masa de 4.5×10^{-5} cm/s.

Se pide calcular:
a) El incremento adimensional del tamaño de cristal η.
b) La velocidad de crecimiento de los cristales.
c) El tiempo necesario del proceso.
d) La expresión de la curva de enfriamiento de acuerdo a la ecuación (12.34).
e) La expresión de la curva de enfriamiento de acuerdo a la ecuación (12.39).
Resp. a) 10.11, b) 0.042 cm/h y c) 2.18 h.

12.3. Rendimiento de cristalización. Una solución salina que pesa 10^4 kg y contiene 30 % en peso de Na_2CO_3, se cristaliza en forma por lotes por enfriamiento hasta una temperatura de 20 °C. La sal cristaliza como decahidrato y presenta una solubilidad a la temperatura final de 21.5 kg de Na_2CO_3 anhidro por 100 kg de agua.

Se pide calcular:
a) El rendimiento de la operación cuando no existe evaporación de agua.
b) El rendimiento de la operación cuando se evapora el 3 % del peso total de la solución.
Resp. a) 78.5 % y b) 81.9 %.

12.4. Calor de cristalización. En una cristalización por lotes se procesan 4,546 kg de una solución acuosa que contiene 47 kg de $FeSO_4$ por cada 100 kg de agua, enfriándose de 54.4 °C hasta 26.6 °C para obtener cristales de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. La solubilidad del sulfato a la temperatura final es de 30.5 kg de $FeSO_4$ anhidro por cada 100 kg de agua. La capacidad calorífica promedio de la alimentación es de 0.7 cal/g−°C. El calor de cristalización de los cristales hidratados puede considerarse igual a −4.4 kcal/gmol.

Se pide calcular:
a) La masa anhidra de cristales.
b) El rendimiento de la operación.
c) El calor removido cuando no hay evaporación de agua.
Resp. a) 683.2 kg, b) 47 % y c) −108,258 kcal.

12.5. Densidad de siembra. En un cristalizador por lotes se requiere alcanzar una densidad de cristales de 250 g/L e incrementar la longitud característica del cristal de 100 a 1000 μm.

Se pide: Estimar la masa de cristales que se requiere sembrar, suponiendo que no existe nucleación y que la densidad del cristal permanece constante..

Resp. 0.25 g/L

12.6. Distribución de cristales. Considerando los datos de la corrida 2 del Ejemplo 12.6.

Se pide: Obtener la distribución teórica de cristales para las mallas 20, 28, 35, 48, 65, 100, 115, 150 y 200.

Resp. 4.42 % de masa es retenida en la malla 65.

12.7. Masa de agua a evaporar. Una solución que contiene 200 g de ácido cítrico por cada 100 g de agua, se somete a un proceso de cristalización por lotes al vacío, a una temperatura de 20 °C. A esta temperatura la solubilidad del ácido es de 0.59 g/g de agua.

Se pide: Estimar la cantidad de agua que es necesario evaporar para obtener una recuperación del 90 % en esta operación.

Resp. 33.89 %

12.8. Cristalización por lotes. En relación al Ejemplo 12.3 del texto.

Se pide:

a) Graficar el perfil de la temperatura de la operación.

b) Graficar la variación con el tiempo de la solubilidad y la concentración de paracetamol en el cristalizador.

c) Obtener la gráfica de la variación con el tiempo de la velocidad de crecimiento de cristales y de la velocidad de nucleación.

d) Establecer un perfil de temperatura para disminuir la desviación estándar de las curvas de densidad poblacional obtenidas.

d) Explicar el efecto del incremento en tiempo (Δt) y en el tamaño de cristal (Δl) sobre los resultados de la simulación.

12.7. Bibliografía

Abbas, A.; Romagnoli, J.A. **2007**. Multiscale modeling, simulation and validation of batch cooling crystallization. *Sep. Purif. Tech.* 53, 153-163.

Barthe S.; Rousseau, R.W. **2006**. Utilization of Focused Beam Reflectance Measurement in the control of crystal size distribution in a batch cooled crystallizer. *Chem. Eng. Tech.* 29, 206-211.

Bakar, M.R.A.; Nagy, Z.K.; Saleemi, A.N.; Rielly, C.D. **2009**. The Impact of direct nucleation control on crystal size distribution in pharmaceutical crystallization processes. *Cryst. Growth Des.* 9, 1378-1384.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley and Sons. New York. 10, 273-305

Bennett, R.C. **1973**. *Miscellaneous Separation Processes.* En: Chemical Enginner's Handbook. Perry, R.H. y Chilton, C.H. (Eds.). McGraw-Hill. New York. Quinta edición. 17, 1-58.

Bennett, R.C. **1988**. Matching crystallizer to material. *Chem. Eng.* 95, 118-127.

Bohlin, M.; Rasmuson, A.C. **1992**. Application of controlled cooling and seeding in batch crystallization. *Canadian J. Chem. Eng.* 70, 120-126.

Charmolue, H.; Rousseau, R.W. **1991**. L- Serine obtained by methanol addition in batch crystallization. *AIChE J.* 37, 1121-1128.

Graber, T.A.; Taboada, M.E. **1991**. Crystallization: An interesting experience in the Ch.E. laboratory. *Chem. Eng. Ed.* Spring. 102-105.

Hekmat, D.; Hebel, D.; Weuster-Botz, D. **2008**. Crystalline proteins as an alternative to standard formulations. *Chem. Eng. Technol.* 31, 911-916.

Kumar, J.; Warnecke, G.; Peglow, M.; Heinrich, S. **2009**. Comparison of numerical methods for solving population balance equations incorporating aggregation and breakage. *Powder Technology.* 189, 218-229.

Lindenberg, C.; Krattli, M.; Cornel, J.; Mazzotti, M. **2009**. Design and optimization of a combined cooling/antisolvent crystallization process. *Cryst. Growth Des.* 9, 1124-1136.

Martino, P.D.; Censi, R.; Malaj, L.; Capsoni, D.; Massarotti, V.; Martelli, S. **2007**. Influence of solvent and crystallization method on the crystal habit of metronidazole. *Cryst. Res. Technol.* 42, 800-806.

Moyers, C.G.; Rousseau, R.W. **1987**. *Crystallization operations.* En: Handbook of Separation Process Technology. Rousseau, R.W. (Ed.) John Wiley and Sons. New York. 11, 578-643.

Omar, W.; Mohnicke, M.; Ulrich, J. **2006**. Determination of the solid liquid interfacial energy and thereby the critical nucleus size of paracetamol in different solvents. *Cryst. Res. Technol.* 41, 337-343.

Qamara, S.; Elsne, M.P.; Angelov, I.A.; Warnecke, G.; Seidel-Morgenstern, A. **2006**. A comparative study of high resolution schemes for solving population balances in crystallization. *Comp. .Chem. Eng.* 30, 1119-1131.

Qiu, Y.; Rasmuson, A.C. **1991**. Nucleation and growth of succinic acid in batch cooling crystallizer. *AIChE J.* 37, 1293-1304.

Wierzbowska, B.; Piotrowski, K.; Koralewska, J.; Matynia, A.; Hutnik, N.; Wawrzyniecki, K. **2008**. Crystallization of vitamin C in a continuous DT MSMPR crystallizer – Size independent growth kinetic model approach. *Cryst. Res. Technol.* 43, 381-389.

Yu, L.; Lionberger, R.; Raw A.; D'Costa R.; Wu H.; Hussain A. **2004**. Applications of process analytical technology to crystallization processes. *Ad. Drug Deliv. Rev.* 56, 349-369.

Capítulo 13

Secado

13.1. Introducción

El secado es el último paso en la recuperación de ciertos productos biotecnológicos. Consiste básicamente en la reducción del contenido de solvente en el producto por medio de una evaporación o una sublimación. Tiene como propósito estabilizar el producto, preservar su actividad, reducir su volumen o recuperar el solvente.

Existen varias formas de secar un material. En el caso de productos biológicos una limitante en la selección del método de secado, es la temperatura que puede soportar el material de interés sin perder actividad, de tal manera que las alternativas para estos materiales son más limitadas.

En la práctica de secado el solvente generalmente es agua y el medio hacia donde ésta se elimina es aire. Por esta razón, el análisis del secado se basa fundamentalmente en los sistemas aire-agua, sin embargo los resultados que se logran pueden ser generalizados a otros sistemas.

Siendo el secado una operación limitada por el equilibrio en la sección 13.2 sobre fundamentos del secado, se revisan los conceptos básicos del equilibrio de los sistemas agua-aire y las formas de efectuar una operación de secado. Asimismo, se revisan las expresiones básicas para el cálculo de la velocidad de secado y de la velocidad de desactivación de compuestos térmicamente lábiles. En la sección 13.3 sobre equipo de secado, se presentan los principales tipos de secadores utilizados en los procesos biotecnológicos. Los principios de diseño de algunos tipos de secadores se presentan en la sección 13.4.

13.2. Fundamentos

El análisis de la operación de secado requiere conocer las relaciones de equilibrio que implica la distribución de agua entre dos fases: a) la sólida del material a secar y b) la gaseosa del aire seco que sirve como medio para tal efecto. Además, es necesario conocer las diferentes formas en que puede ser conducida

una operación de secado. Asimismo, se requiere el conocimiento de la cinética de secado que depende de la velocidad de transferencia de calor y de la velocidad de evaporación (Tsotsas *et al.*, 2003). Una cinética necesaria de considerar en esta operación que no tiene paralelo con otras operaciones, es la velocidad de desactivación del material de interés por efectos térmicos.

De acuerdo a lo anterior en esta sección se revisan los siguientes aspectos de la operación de secado:

- Las relaciones de equilibrio que limitan la operación de secado.
- Los métodos diponibles para realizar la operación de secado.
- La velocidad de secado que determina el tiempo para llevar a cabo la operación.
- Los efectos colaterales del secado.

13.2.1. Equilibrio y Propiedades Térmicas

Si un sólido húmedo se expone a una corriente continua de aire, puede ganar o perder humedad dependiendo de la presión de vapor que ejerza el agua del sólido y de la presión de vapor de la corriente del aire. Si la presión de vapor del agua del sólido es mayor que la presión de vapor del aire, entonces el sólido pierde humedad, en el caso contrario su humedad aumenta. Cuando la presión de vapor del agua del sólido iguala la presión de vapor de la corriente de aire, entonces el sistema está en equilibrio.

La presión de vapor que ejerce la humedad contenida en un sólido depende de la forma de la humedad, el tipo de sólido y la temperatura.

En la mayoría de los materiales biológicos se pueden distinguir dos formas del agua contenida en el sólido: agua libre y agua ligada.

El agua libre se caracteriza por ejercer una presión de vapor igual a la del agua pura. Este tipo de agua se localiza en los espacios entre las células de los materiales o en los capilares de precipitados porosos.

El agua ligada se caracteriza por ejercer una presión de vapor menor a la del agua pura. Este comportamiento lo presenta el agua cuando está contenida en el interior de células. También en el caso de algunos caldos donde los solutos alteran las propiedades del agua o ésta forma enlaces con sustancias orgánicas.

Curva de secado: humedad relativa vs humedad de sólido

En la Figura 13.1 se presenta una curva de equilibrio típica entre un material biológico y un gas como el aire a una temperatura dada.

En el eje de las ordenadas de la Figura 13.1 se grafica la humedad relativa del aire definida como:

$$H_r = \frac{\text{Presión parcial del agua en el aire}}{\text{Presión de vapor del agua pura}} \tag{13.1}$$

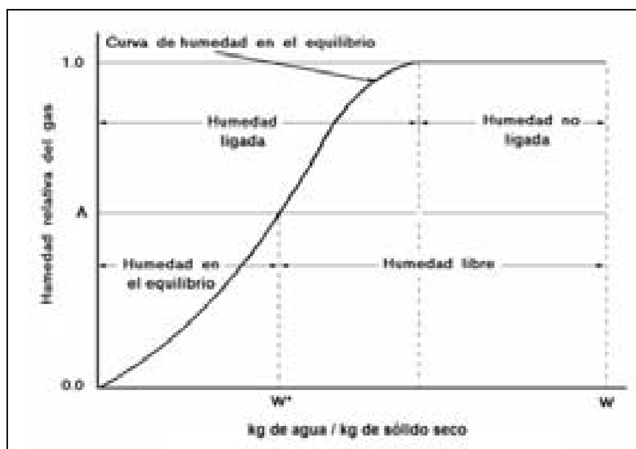


Figura 13.1: Curva de equilibrio para secado de un sólido.

y en el eje de las abscisas la humedad del sólido definida como:

$$W = \frac{\text{Masa agua}}{\text{Masa seca de sólido}} \tag{13.2}$$

esta definición es útil cuando la masa de sólido es constante.

En la Figura 13.1 se distinguen dos zonas características: a) la zona de humedad no ligada y b) la zona de humedad ligada. La zona de humedad ligada comprende desde una humedad $W = 0$ hasta una humedad tal que la presión de vapor del sólido es igual a la del agua pura. Un sólido con tal humedad estará en equilibrio con aire cuya presión parcial de vapor sea igual a la del agua pura, es decir, cuya humedad relativa sea igual a la unidad. En la zona de humedad no ligada, la humedad del sólido puede ser mayor pero su presión de vapor es constante e igual a la del agua pura. De tal manera que la H_r permanece constante e igual a la unidad.

Ejemplo 13.1. Agua no-ligada y ligada. La humedad de una masa de cristales de un antibiótico es de $W = 0.28$ g de agua/g de antibiótico seco. En el equilibrio con aire al 100 % de humedad relativa el contenido de humedad del antibiótico es de $W = 0.20$ g de agua/g de antibiótico seco.

Se pide calcular:

a) El porcentaje de agua ligada.

b) El porcentaje de agua no-ligada.

Solución:

$$\%\ \text{Humedad ligada} = 0.20\ \frac{\text{g agua}}{\text{g peso seco}} \times 100 = 20\ \%$$

$$\%\ \text{Humedad no ligada} = (0.28 - 0.20)\ \frac{\text{g agua}}{\text{g peso seco}} \times 100 = 8\ \%$$

Carta psicométrica

En la operación de secado se requiere conocer, a diferentes temperaturas y presiones, las propiedades térmicas y las relaciones de equilibrio entre el solvente en el sólido y el aire que se utilice para secar. Debido a que el agua no ligada se comporta como agua pura, las relaciones de equilibrio de los sistemas aire-agua pueden ser utilizadas para tal efecto. Asimismo, estas relaciones de equilibrio agua-aire son requeridas para describir el comportamiento del aire que se utiliza en la operación de secado, dado que éste generalmente es calentado antes de usarse.

Las relaciones de equilibrio vapor de agua-aire se presentan en forma de una carta psicométrica como la Figura 13.2, la cual ha sido desarrollada a la presión de una atmósfera.

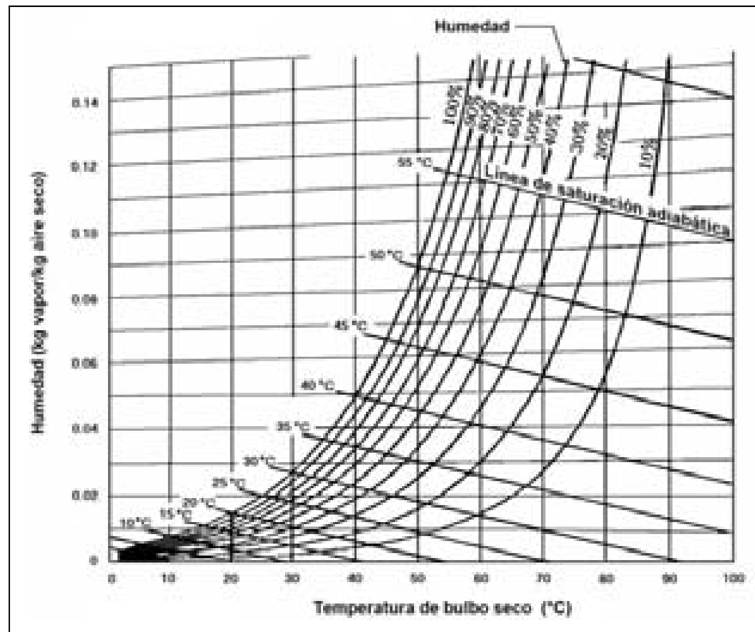


Figura 13.2: Carta psicométrica agua-aire. Presión de una atmósfera.

Para utilizar adecuadamente la carta psicométrica es necesario manejar varios términos, algunos de ellos referidos a la masa de aire seco, ya que en un proceso de secado esta cantidad puede considerarse constante. A continuación se describen diez de estos términos.

1. Humedad La humedad H de una mezcla aire-agua (humedad específica o humedad absoluta) se define como la masa de vapor de agua por unidad de masa de aire seco.

$$H = \frac{\text{masa agua}}{\text{masa aire seco}} \tag{13.3}$$

Utilizando la ecuación general de los gases ideales se puede expresar la ecuación (13.3) como:

$$H = \left(\frac{P_A}{P_T - P_A}\right)\left(\frac{M_A}{M_B}\right) \tag{13.4}$$

donde:

P_A: Presión parcial del agua en el aire.

P_T: Presión total de la mezcla aire-agua.

M_A: Peso molecular del agua (18 g/mo$l$).

M_B: Peso molecular del aire (29 g/mol).

Se puede deducir de la ecuación anterior que la humedad sólo depende de la presión parcial del agua y de la presión total del sistema.

2. Humedad de saturación Una mezcla aire-agua está saturada a cierta temperatura y presión, cuando la presión parcial del agua en la mezcla es igual a la presión de vapor del agua pura, de tal manera que:

$$H_S = \left(\frac{P_{AS}}{P_T - P_{AS}}\right)\left(\frac{M_A}{M_B}\right) \tag{13.5}$$

donde P_{AS} es la presión de vapor del agua pura a la temperatura y presión dadas y H_S es la humedad de saturación.

3. Porcentaje de humedad El porcentaje de humedad se define como la relación porcentual de la humedad con respecto a la humedad de saturación, es decir

$$\%\ H = \left(\frac{H}{Hs}\right) \times 100 \tag{13.6}$$

4. Relación entre $\%\ H$ y H_r Es necesario advertir que el porcentaje de humedad no es igual al porcentaje de humedad relativa. Esto puede ser demostrado combinando las ecuaciones (13.4), (13.5) y (13.6),

$$\%\ H = \left(\frac{P_A}{P_{AS}}\right)\left(\frac{P_T - P_{AS}}{P_T - P_A}\right) \times 100$$

y comparar este resultado con la ecuación (13.1).

Ejemplo 13.2. Cálculo de humedad a partir de datos de presión de vapor.

El aire de una habitación tiene una temperatura de 20 °C y la presión es de una atmósfera. La presión parcial del agua en el aire es de 12 mm de Hg.

Se pide calcular:

a) La humedad, H.

b) La humedad de saturación, H_S.

c) El porcentaje de humedad, % H.

d) El porcentaje de humedad relativa, % H_r.

Solución:

a) La humedad H puede calcularse aplicando la ecuación (13.4),

$$\begin{aligned} H &= \left[\frac{12 \text{ mm de Hg}}{(760-12) \text{ mm de Hg}}\right]\left(\frac{18 \dfrac{\text{kg}}{\text{kmol}}}{29 \dfrac{\text{kg}}{\text{kmol}}}\right) \\ H &= 0.01 \ \frac{\text{kg de agua}}{\text{kg de aire seco}} \end{aligned}$$

b) En tablas de vapor puede encontrarse que a 20 °C la presión de vapor de agua es de 17.5 mm de Hg. Aplicando la ecuación (13.5),

$$H_S = \left[\frac{17.5 \text{ mm de Hg}}{(760-17.5) \text{ mm de Hg}}\right]\left(\frac{18 \dfrac{\text{kg}}{\text{kmol}}}{29 \dfrac{\text{kg}}{\text{kmol}}}\right) = 0.0146 \ \frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}}$$

c) El porcentaje de humedad se pude calcular utilizando la ecuación (13.6) y los resultados anteriores,

$$\% \ H = \frac{0.01}{0.0146} \times 100 = 68.4\,\%$$

d) La humedad relativa se calcula con la ecuación (13.1),

$$\% \ H_r = \left(\frac{12 \text{ mm de Hg}}{17.5 \text{ mm de Hg}}\right) \times 100 = 68.57 \ \%$$

Ejemplo 13.3. Curva de 100 % de humedad.

En el cálculo de la humedad de una mezcla aire-agua a una presión total de una atmósfera, se puede considerar que la presión parcial del agua en la mezcla, es igual a la presión del agua pura a la temperatura dada.

Se pide: Construir una gráfica de la humedad de una mezcla aire-agua en el rango de 0 a 100 °C.

Solución:

Tabla 13.1: Datos y solución del Ejemplo 13.3.

T (°C)	P_{AS} (kPa)	H_S $\left(\frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}}\right)$
3	0.7577	0.0047
18	2.0640	0.0129
33	5.0340	0.0324
60	19.9400	0.1521
75	38.5800	0.3816
90	70.1400	1.3958
95	84.5500	3.1275

En las columnas (1) y (2) de la Tabla 13.1 se presenta la presión de vapor para el agua pura a varias temperaturas en el rango considerado. Estos valores son obtenidos de tablas de vapor.

En la columna (3) de la Tabla 13.1 se encuentran los datos de H_S calculados mediante la ecuación (13.5) a una presión total de una atmósfera (101.33 kPa). El valor de H_S tiende a infinito conforme la presión de vapor se aproxima a la de la temperatura de ebullición del agua.

La curva de 100 % de humedad de la carta psicométrica (Fig. 13.2) representa la solución gráfica de este ejemplo. La curva de 50 % de humedad de la carta psicométrica puede trazarse tomando la mitad de la distancia vertical entre la curva de saturación y el eje de la temperatura, a cada temperatura.

5. Punto de rocío El punto de rocío de una mezcla aire-agua es la temperatura a la cual dicha mezcla (sin estar en contacto con agua) se satura al ser enfriada a presión total constante. Cuando una mezcla en su punto de rocío se enfría más allá de este punto, el vapor de agua condensa formando una neblina o rocío. En este proceso la humedad de la mezcla no cambia, de tal manera que se puede calcular el punto de rocío de una mezcla utilizando la carta psicométrica.

Ejemplo 13.4. Cálculo del punto de rocío de una mezcla aire-agua.

Se pide: Estimar el punto de rocío de una mezcla aire-agua con 20 % de humedad que se encuentra a 55 °C y a una atmósfera de presión.

Solución:

Sobre la carta psicométrica (Fig. 13.2) se localiza el punto 55 °C y 20 % humedad, horizontalmente se avanza hacia la curva de 100 % humedad y se lee la temperatura de rocío de 26.5 °C en el eje T. Todas las mezclas con humedad de 0.023 tendrán el mismo punto de rocío.

6. Calor húmedo de una mezcla aire-vapor de agua El calor húmedo es la capacidad calorífica de la mezcla aire-vapor de agua. Es el calor necesario para incrementar un grado centígrado la temperatura de una mezcla aire-vapor de agua, por kg de aire seco de la mezcla, o

$$C_S = C_B + HC_A \tag{13.7}$$

donde:

C_S: Calor húmedo de la mezcla en kJ/(kg aire seco – °K).

C_B: Capacidad calorífica del aire seco. 1.005 kJ/ (kg aire seco – °K).

C_A: Capacidad calorífica del vapor de agua. 1.884 kJ/(kg vapor – °K).

kJ: Kilojoules, unidad de energía.

Dado que las capacidades caloríficas pueden considerarse constantes en el intervalo normal de temperaturas, la ecuación (13.7) puede expresarse como:

$$C_S = 1.005 + 1.884H \quad \left[\frac{kJ}{\text{kg aire seco} - {}^\circ\text{K}}\right] \tag{13.8}$$

Cuando no existe cambio de estado (evaporación o condesación) el calor necesario para incrementar la temperatura ΔT grados de una masa m_B de aire y su vapor acompañante, puede ser calculada con la siguiente expresión:

$$Q = m_B C_S \Delta T \tag{13.9}$$

Ejemplo 13.5. Cálculo del calor húmedo de una mezcla aire-agua. Se pide:

a) Calcular el calor húmedo de una mezcla aire-vapor de agua que se encuentra a 55 °C y presenta una humedad $H = 0.08$ kg de agua/kg de aire seco.

b) Estimar el calor necesario para incrementar 15 grados la temperatura a 5.0 kg de aire seco y su vapor acompañante de la mezcla anterior.

Solución:

a) El calor húmedo puede calcularse utilizando la ecuación (13.8),

$$C_S = 1.005 + (1.884)(0.08) \quad \left[\frac{\text{kJ}}{\text{kg aire seco} - {}^\circ\text{K}}\right] = 1.156 \ \frac{\text{kJ}}{\text{kg aire seco} - {}^\circ\text{K}}$$

b) El calor necesario puede calcularse utilizando la ecuación (13.9),

$$Q = 5 \text{ kg aire seco} \times 1.156 \ \frac{\text{kJ}}{\text{kg aire seco} \ - {}^\circ\text{K}} \times 15 \ {}^\circ\text{K} = 86.7 \text{ kJ} = 363 \text{ kcal}$$

7. Volumen húmedo El volumen húmedo es el volumen total que ocupa una mezcla aire-vapor de agua por kg de aire seco a la presión de una atmósfera. De acuerdo a la ley de los gases ideales el volumen húmedo puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$V_H = (0.00283 + 0.00456H)\ (T + 273) \quad \left[\frac{\text{m}^3 \text{ mezcla}}{\text{kg aire seco}}\right] \tag{13.10}$$

8. Entalpia total La entalpia total de un kg de aire seco y su vapor acompañante referida a una temperatura T_o, está dada por el calor sensible de la mezcla aire-vapor de agua más el calor latente del vapor de agua a la temperatura T_o, esto puede expresarse como:

$$Ent = C_S(T - T_o) + H\lambda_o \tag{13.11}$$

Cuando $T_o = 0$ °C el calor latente $\lambda_o = 2,502$ kJ/kg y la ecuación (13.11) se expresa como:

$$Ent = (1.005 + 1.884H)T + 2502H \quad \left[\frac{\text{kJ}}{\text{kg aire seco}}\right] \tag{13.12}$$

en la ecuación anterior T está en °C.

9. Curvas de saturación adiabática Considérese un proceso como el que se muestra en la Figura 13.3. En éste, una mezcla aire-vapor de agua a una temperatura T y una humedad H (no saturada) se pone en contacto con gotas de agua a una temperatura inicial T_i. Si el tiempo de contacto es el suficiente el sistema alcanza el equilibrio, de tal manera que la mezcla aire-vapor sale con una humedad saturada H_S a una temperatura T_S (el aire cede calor sensible para evaporar el líquido). La temperatura del agua de recirculación se estabiliza en T_S. No fluye calor hacia dentro o hacia fuera del sistema y al fenómeno se le denomina proceso adiabático.

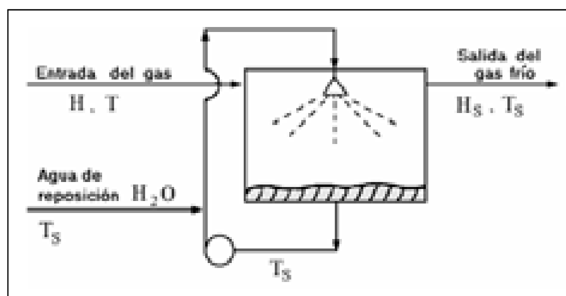


Figura 13.3: Proceso de enfriamiento adiabático de aire con agua.

Efectuando un balance de energía en la mezcla aire-vapor se obtiene,

$$\text{Entalpia a la entrada} = \text{Entalpia a la salida}$$

Si se toma como temperatura de referencia T_S este balance se expresa como:

$$C_S(T - T_S) + H\lambda_S = C_S(T_S - T_S) + H_S\lambda_S \tag{13.13}$$

combinado las ecuaciones (13.8) y (13.13) se tiene:

$$\frac{(H - H_S)}{(T - T_S)} = -\frac{C_S}{\lambda_S} = -\frac{(1.005 + 1.884H)}{\lambda_S} \tag{13.14}$$

Las curvas de saturación adiabática de la carta psicométrica (Fig. 13.2) han sido construidas utilizando la ecuación (13.14).

En el caso que el contacto no sea suficiente para alcanzar H_S y T_S a la salida, la mezcla presentará una temperatura y una humedad menor, localizadas sobre la misma línea de saturación adiabática.

Ejemplo 13.6. Saturación adiabática.

Se tiene una mezcla aire-vapor a 80 °C con una humedad de 0.032 kg de agua/kg aire seco. Este aire se enfría y humidifica adiabáticamente.

Se pide estimar:

a) La temperatura y humedad final si la mezcla alcanza un 90 % de humedad.

b) La temperatura y humedad final si la mezcla se satura de humedad.

Solución:

a) Sobre la carta psicometrica se localiza la temperatura y humedad que representa a la mezcla original (80 °C y humedad de 0.032 kg de agua/kg aire seco). Entonces esta mezcla se humidifica y enfría adiabáticamente, siguiendo una curva de saturación adiabática, hasta el cruce con la curva de 90 % de humedad donde se lee:

$$T = 43\ ^\circ\text{C}; \quad H = 0.049\ \frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}}$$

b) Continuando sobre la misma línea de saturación adiabática hasta la intersección con la curva del 100 %, se puede leer:

$$T_S = 40\ ^\circ\text{C}; \quad H_S = 0.05\ \frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}}$$

10. Temperatura de bulbo húmedo La temperatura de bulbo húmedo es la temperatura de estado estable que alcanza una pequeña masa de agua cuando se pone en contacto con una corriente de aire en condiciones adiabáticas.

Para determinar temperaturas de bulbo húmedo se puede utilizar un termómetro cuyo bulbo se recubre con una tela impregnada de agua. El termómetro se sujeta mediante una cuerda y se hace girar en el aire. Si el aire no está saturado se produce un descenso en la lectura del termómetro debido a la evaporación de agua de la tela. La lectura final de estado estacionario es la temperatura

de bulbo húmedo (en contraposición, a la lectura normal del termómetro se le llama temperatura de bulbo seco).

Para sistemas aire-agua (únicamente) la descripción del proceso adiabático del bulbo húmedo puede realizarse en forma satisfactoria mediante la ecuación de saturación adiabática.

La importancia práctica del análisis anterior, es que mediante mediciones de temperaturas de bulbo húmedo y bulbo seco, y con auxilio de la carta psicométrica, es posible determinar con relativa facilidad la humedad de mezclas aire-vapor de agua.

Ejemplo 13.7. Determinación de humedad.

Una mezcla de aire-vapor de agua tiene una temperatura de 70 °C. La temperatura de bulbo húmedo de esta mezcla es de 30 °C.

Se pide: Calcular la humedad de la mezcla.

Solución:

Se puede suponer que la temperatura de bulbo húmedo es igual a la temperatura de saturación adiabática. Recorriendo la curva de saturación adiabática de 30 °C hasta la temperatura de bulbo seco de 70 °C, se puede leer la humedad de 0.01 kg agua/kg aire seco.

13.2.2. Métodos de Secado

El método de secado que debe ser utilizado en un bioproceso depende del tipo de producto, sus propiedades físicas, su tolerancia a la temperatura y los requerimientos de proceso en cuanto a la forma de operación ya sea intermintente o continua.

Los métodos de secado se pueden clasificar de acuerdo a la forma de transferir calor y eliminar el solvente en dos tipos: a) adiabáticos y b) no adiabáticos.

Métodos adiabáticos

Estos métodos consisten en el secado por medio de adición de calor con aire caliente. Los secadores por aspersión y los secadores de tipo instantáneo operan de acuerdo a este método. Son utilizados para secar partículas que no toleran altas temperaturas como proteínas unicelulares y enzimas.

Métodos no adiabáticos o por conducción

En el secado no adiabático el calor se proporciona en forma indirecta por conducción a través de una pared metálica. Generalmente los secadores no adiabáticos operan a presión reducida y se emplean para el secado de cristales y precipitados, donde las temperaturas de secado deben ser menores a 60 °C.

El secado por congelamiento, un caso de secado no adiabático, se efectúa por sublimación de agua congelada empleando bajas presiones y temperaturas. Se emplea para secar proteínas terapéuticas que no toleran temperaturas arriba de las ambientales.

13.2.3. Velocidad de Secado: transferencia de calor y masa

En el diseño de secadores, además de las relaciones de equilibrio, es necesario establecer relaciones que permitan determinar la velocidad del secado o el tiempo de secado. Debido a que el conocimiento de los mecanismos básicos del secado no es completo, frecuentemente es necesario efectuar mediciones experimentales de la velocidad de secado.

Cuando se seca un sólido ocurren dos procesos fundamentales y en forma simultánea: a) se transfiere calor para evaporar un líquido y b) se transfiere masa: como líquido o vapor al interior de sólido, y como vapor del sólido al aire.

Los factores que controlan la velocidad de estos procesos determinan la velocidad del secado. Los mecanismos de transferencia de masa están íntimamente relacionados con el tipo de sólido a secar (homogéneo, granular, etc), mientras que la forma de transferir calor depende del método de secado (adiabático o no adiabático).

Existen dos enfoques fundamentales para modelar los procesos de secado: a) modelos de parámetros agrupados y b) modelos de parámetros distribuidos. El primero supone que las propiedades físicas y los componentes de los materiales a secar permanecen uniformes a través del lecho del material. Los modelos de parámetros distribuidos permiten una diferente composición del material en determinadas regiones (Katekawa y Silva, 2006; Wang y Langrish, 2009).

13.2.4. Efectos Colaterales del Secado

Cuando el secado de un material no se realiza apropiadamente, se presentan daños que afectan la calidad del producto. En el caso de productos biotecnológicos los daños típicos que se presentan en el secado son: endurecimiento, deshidratación química y desnaturalización.

El fenómeno de endurecimiento se presenta cuando la velocidad de secado es muy alta y el sólido forma una capa interior húmeda y una capa exterior seca e impermeable, que impide la evaporación y el secado apropiado. Este fenómeno puede evitarse disminuyendo la velocidad de secado.

La deshidratación química consiste en la eliminación de agua de la estructura molecular del producto y también se origina por una velocidad de secado alta.

El tercer tipo de daño es la desnaturalización que sufren las proteínas en el secado. Este proceso generalmente sigue una cinética de primer orden que depende de la concentración de agua, la temperatura y el tiempo de secado, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{dP_r}{dt} = -k_o \left[\exp\left(-\frac{E}{RT} \right) \right] (P_r) \tag{13.15}$$

donde:

P_r: Medida de la concentración de la proteína no desnaturalizada.

k_o: Constante característica del material. $[t^{-1}]$.

E: Energía de activación del material. [cal/mol].

R: Constante de los gases ideales. [cal/(mol – °K)].

T: Temperatura absoluta. [°K].

La integración de la ecuación (13.15) entre los límites:

$$t = t_o \qquad P_r = P_{ro}$$

$$t = t \quad P_r = P_r$$

genera la expresión:

$$\ln\left(\frac{P_{ro}}{P_r}\right) = k_o \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) t \tag{13.16}$$

Entre menor sea la temperatura y el tiempo de secado, menor es el grado de desnaturalización. Generalmente es más conveniente utilizar una combinación de una temperatura baja con un tiempo alto de secado, para evitar una desnaturalización excesiva.

Ejemplo 13.8. Desnaturalización de catalasa.
Cuando se seca una pasta concentrada de la enzima catalasa a 37 °C por 10 min se desnaturaliza 63 % de la enzima. Mientras que cuando se seca esta pasta a 20 °C por 30 min, se desnaturaliza sólo un 28 %.

Se pide: Estimar el grado de desnaturalización cuando el material se seca a 4 °C por 90 min.

Solución:

Utilizando la ecuación (13.16) se pueden obtener dos ecuaciones que permiten determinar los parámetros k_o y E.

$$\ln\left[\frac{P_{ro}}{(P_{ro} - 0.63\ P_{ro})}\right] = k_o \left[\exp\left(\frac{-E}{1.99\ \dfrac{\text{cal}}{\text{mol} - {}^\circ\text{K}} \times 310\ {}^\circ\text{K}}\right)\right] \ (10\ \text{min})$$

$$\ln\left[\frac{P_{ro}}{(P_{ro} - 0.28\ P_{ro})}\right] = k_o \left[\exp\left(\frac{-E}{1.99\ \dfrac{\text{cal}}{\text{mol} - {}^\circ\text{K}} \times 293\ {}^\circ\text{K}}\right)\right] \ (30\ \text{min})$$

resolviendo las expresiones anteriores se obtiene:

$$E = 23,453\ \frac{\text{cal}}{\text{mol}}$$

$$k_o = 3.22 \times 10^{15}\ \text{min}^{-1}$$

Con estos parámetros se puede estimar el grado de desnaturalización utilizando la misma ecuación con $T = 4$ °C y $t = 90$ min.

$$\ln \frac{P_{ro}}{P_r} = \left(3.22 \times 10^{15} \text{ min}^{-1}\right) \left[\exp \left(\frac{-23453 \ \frac{\text{cal}}{\text{mol}}}{1.99 \ \frac{\text{cal}}{\text{mol} - {}^\circ\text{K}} \times 277 \ {}^\circ\text{K}} \right) \right] (90 \text{ min})$$

$$\frac{P_r}{P_{ro}} = 0.91$$

Bajo estas condiciones se desnaturaliza sólo el 9 % de la enzima.

13.3. Equipos de Secado

Los equipos de secado son muy variados. Los empleados en los procesos biotecnológicos se pueden clasificar de acuerdo al método de secado empleado en:

- Secadores adiabáticos.
- Secadores no adiabáticos.

13.3.1. Secadores Adiabáticos

Los secadores adiabáticos producen el secado empleando el flujo de entrada de un gas caliente y seco. El gas evapora líquido del sólido y sale frío y húmedo. Los principales tipos de secadores adiabáticos (Quinn, 1983) son: a) secadores por aspersión, b) secadores instantáneos y c) secadores de lecho fluidizado.

Secador por aspersión

En los equipos de secado por aspersión (Fig. 13.4) es posible secar soluciones o suspensiones de sólidos, rociando éstas en un recipiente a través del cual se hace pasar una corriente de aire caliente. Los sólidos secos se colectan en el fondo del secador y del fondo de ciclones que se utilizan para procesar los polvos de salida del secador.

Los secadores por aspersión son utilizados para la producción de grandes volúmenes de productos termolábiles como enzimas, bacterias, levaduras, fármacos y proteínas (Prabakaran y Hoti, 2007; Sloth *et al.*, 2009).

Uno de los componentes claves del secador por aspersión es el atomizador que permite formar pequeñas gotitas de la mezcla incrementando notablemente el área de secado, de tal manera que el tiempo del secado sea menor que el tiempo que dura la gota en alcanzar la pared del recipiente.

Existen dos tipos básicos de atomizadores: a) los tipo disco giratorio (15,000 a 24,000 rpm) y b) los tipo de eyector a presión. El primero es más empleado en

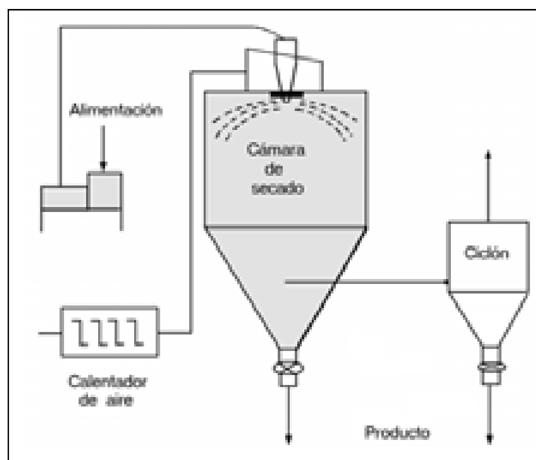


Figura 13.4: Secado por aspersión. Tomada de: Brocklebank, 1990.

los procesos biotecnológicos debido a que presentan menos problemas de taponamiento y ofrece la posibilidad de controlar el tamaño de la gota controlando la velocidad del disco.

Las capacidades de los secadores por aspersión son muy variadas. Las capacidades de evaporación varían de 1.0 kg/h hasta 2.0 ton/h de agua, con dimensiones típicas de $2 \times 2 \times 3.5$ m para los modelos pequeños y de $10 \times 5 \times 12$ m para los modelos intermedios.

Secador instantáneo

Los secadores instantáneos o flash (Fig. 13.5) son utilizados para secar sólidos de baja humedad o sólidos difíciles de manejar por formar partículas muy pequeñas o ser muy pegajosos en forma seca (proteínas y almidón).

En un secador instantáneo el material sólido que se va a secar se alimenta conjuntamente con aire caliente a un ducto, a través del cual el sólido viaja y se seca por acción del aire. Al final del ducto la corriente de aire-sólido se separa por acción de un ciclón. Parte de la corriente es recirculada para secar las partículas grandes que son más difíciles de secar. Si debido a su tamaño las partículas de la alimentación no pueden ser transportadas por el secador, el secador puede incorporar un molino desintegrador a la entrada del ducto de secado.

Secador de lecho fluidizado

El secador de lecho fluidizado (Fig. 13.6) puede ser utilizado para secar rápidamente materiales sólidos que permitan su fluidización por medio de una

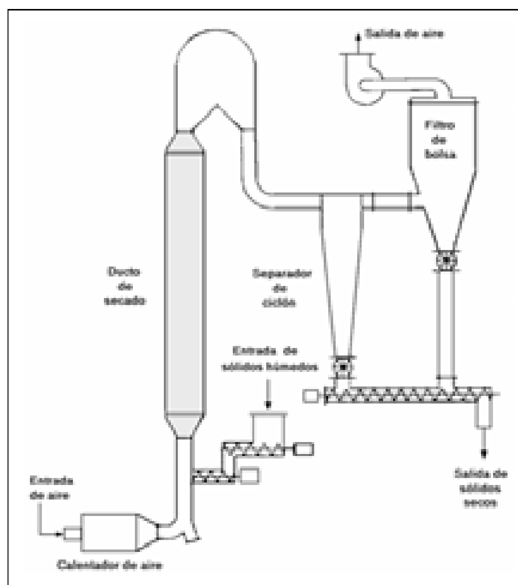


Figura 13.5: Esquema de un secador instantáneo.

corriente de aire caliente (Treybal, 1980). El material se alimenta a un lecho soportado por una malla inferior y se le hace pasar una corriente de aire caliente, de tal manera que las partículas del sólido se separan y forman una suspensión fluida, que permite su transporte hasta el punto de descarga. Los secadores de lecho fluidizado continuos pueden ser circulares, cuadrados o rectangulares en su sección de flujo. Pueden alcanzar capacidades de hasta 10 ton/h de producto seco, mientras que los intermitentes son utilizados en escalas más pequeñas del orden de 500 kg/lote.

13.3.2. Secadores no Adiabáticos

Los secadores no adiabáticos requieren un sistema de calentamiento y generalmente trabajan con sistemas de vacío. Los principales secadores no adiabáticos utilizados en biotecnología son: el tipo charola, el de doble cono, el tambor rotatorio y el liofilizador (De Vivo, 1983).

Secador de charolas

Los secadores de charolas (Fig. 13.7), son utilizados a escala piloto o para producciones bajas de productos de alto valor económico, susceptibles a temperaturas elevadas o a daño por manejo mecánico excesivo.

En el secador de charolas la muestra se coloca en las charolas que se introducen a una cámara. Las charolas son calentadas por medio de chaquetas de

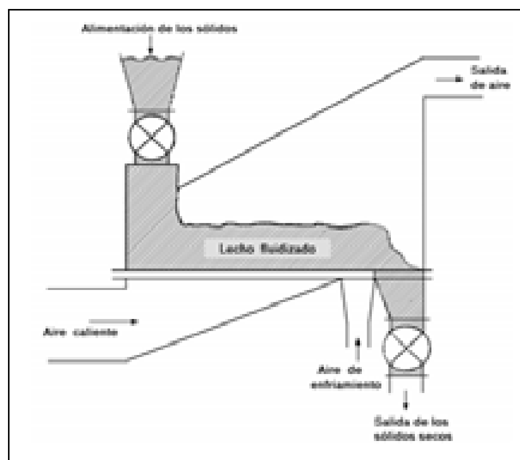


Figura 13.6: Esquema de un secador de lecho fluidizado.

vapor y la cámara cuenta con un sistema de vacío, lo cual permite el secado de la muestra a condiciones moderadas.

Secador de doble cono

El secador de doble cono es un secador giratorio al vacío (Fig. 13.8a), que tiene dos conos unidos por sus bases por medio de un cilindro corto. Este recipiente gira sobre un eje para inducir el movimiento del material y evitar zonas de sobrecalentamiento. El secador cuenta con un sistema de vacío para facilitar el secado.

Este tipo de secador es ampliamente utilizado en la obtención de productos biotecnológicos a escala industrial.

Secador de tambor rotatorios

Un secador tipo tambor rotatorio muy utilizado industrialmente consiste de un recipiente cilíndrico horizontal que no gira y el movimiento del material se realiza por acción de agitadores internos que remueven el material de las paredes calientes del tambor (Fig. 13.8b). Estos equipos generalmente operan por lotes y el calor se provee por medio de agua caliente que fluye por una chaqueta o por un tubo concéntrico a la flecha.

Liofilizadores

Los liofilizadores son utilizados para obtener sólidos secos de alto valor comercial. Se emplean cuando los sólidos son muy lábiles o frágiles para ser tratados por un método convencional de secado o una filtración, o bien son muy

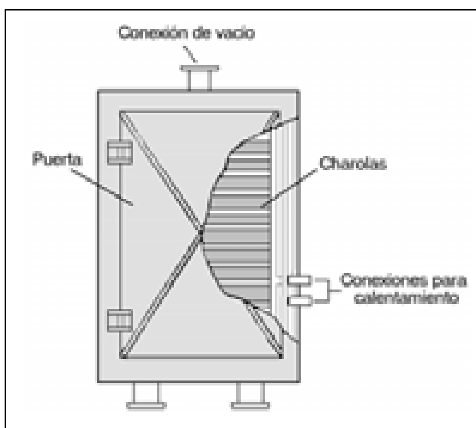


Figura 13.7: Esquema de un secador de charolas.

solubles (sales de sodio) de tal manera que no pueden ser obtenidos por precipitación o cristalización. La liofilización ha sido empleada para la obtención de enzimas, hormonas y otro tipo de proteínas de uso farmacéutico.

En un proceso de liofilización (Fig. 13.9) la solución a secar, con una concentración entre 5-25 % peso/volumen, se alimenta a un sistema de filtrado (0.2 μm) para ser esterilizada y entrar al secador que opera en forma estéril. En el proceso de secado la solución primero se congela, y posteriormente se deshidrata mediante un sistema de calentamiento y un sistema de vacío, acoplados de tal manera que el agua de la muestra siempre esté en forma sólida y su pérdida sea sólo por sublimación.

Recientemente se ha investigado el uso de liofilizadores que operan a la atmósfera como una alternativa a los liofilizadores al vacío con el propósito de reducir los costos de operación en el secado (Claussen *et al.*, 2007).

13.4. Diseño de Secadores

El diseño confiable de sistemas de secado de materiales biológicos generalmente requiere experimentos de laboratorio para determinar propiedades del material a secar y las condiciones de operación, una vez que se ha seleccionado cuidadosamente el tipo de secador. La teoría de secado y el usos de correlaciones empíricas son útiles para estimar el tamaño del secador y el tiempo de secado.

Una vez establecidos los requerimientos de diseño, se desarrolla el diagrama del sistema de secado para cumplir con las especificaciones de diseño. Seguidamente se calculan los balances de masa y energía para obtener los parámetros del proceso como flujo de aire necesario, capacidad de los sopladores y el calor transferido en los intercambiadores. Finalmente se selecciona el equipo necesario. Es importante considerar que actualmente existe una gran diversidad de

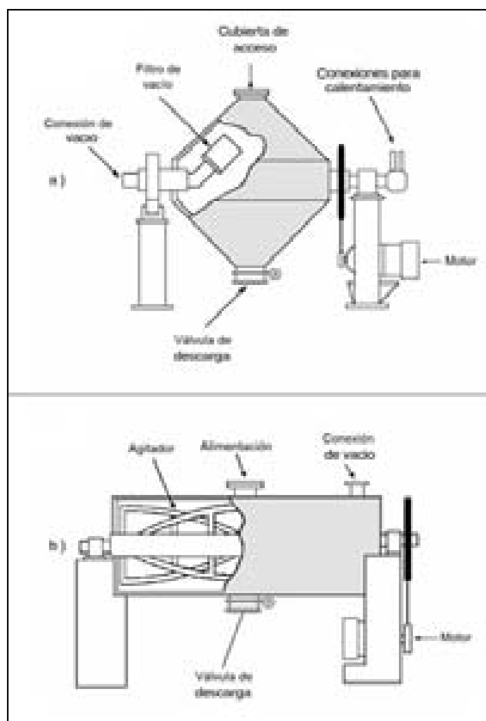


Figura 13.8: Esquemas de secadores giratorios. a) Secador de doble cono y b) Secador de tambor.

software comercial para apoyar en este proceso de diseño y análisis de sistemas de secado (Gong y Mujumdar, 2008).

Los métodos para el diseño de equipos de secado están íntimamente relacionados con la forma en que se transfiere el calor en el equipo y con el grado de complejidad de la descripción del mismo. Dos tipos de diseño de secadores son de particular importancia:

- Diseño de secadores adiabáticos.

- Diseño de secadores no adiabáticos.

13.4.1. Diseño de Secadores Adiabáticos: Calor convectivo

Los secadores adiabáticos son utilizados para secar: a) sólidos (porosos o no porosos) y b) suspensiones de productos de interés.

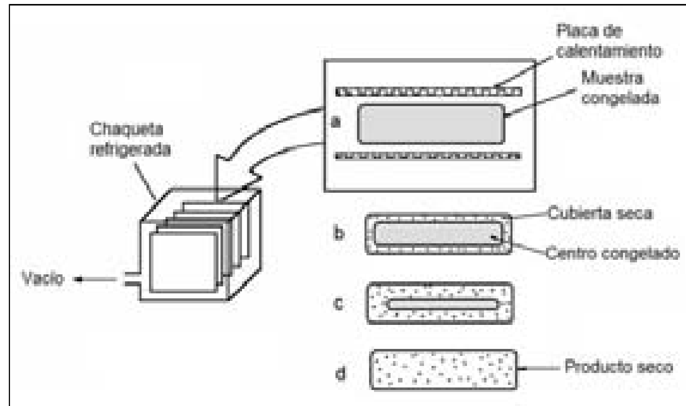


Figura 13.9: Esquema de un liofilizador de placas y del proceso de liofilización. La muestra pierde humedad de la periferia al centro (a-d).

Secado de sólidos

Para obtener experimentalmente la velocidad de secado de un material sólido, se procede a colocar una muestra en una charola, de tal manera que sólo se exponga la superficie del sólido a la corriente de aire que se utilice para secar. La variación de la humedad del sólido puede medirse por medio de una balanza. Las condiciones de secado deben ser constantes y aproximadamente iguales a las que se utilizarán a gran escala.

Curvas de secado La Figura 13.10 muestra una curva típica de un secado experimental. La Figura 13.10a muestra la variación del contenido de humedad de sólido (W) con el tiempo. Diferenciando estos datos se puede obtener la velocidad de secado y graficarla contra el contenido de humedad como aparece en la Figura 13.10b, o contra el tiempo.

Revisando la forma de las curvas de la Figura 13.10 se observan dos regiones: La región A-B de las curvas (de 0 a t_c), donde la humedad del sólido desciende linealmente y la velocidad de secado se mantiene constante, llamada región de velocidad de secado constante; y la región B-C de las curvas donde la humedad decrece en forma más lenta y la velocidad de secado disminuye con el tiempo, llamada región de velocidad de secado decreciente.

Las regiones características del secado pueden ser racionalizadas en función de los conceptos: a) agua libre en el sólido y b) agua ligada en el sólido.

En la región de velocidad de secado constante, se presenta la evaporación del agua libre, de tal manera que su movimiento a través del sólido por capilaridad o difusión es más rápido que su velocidad de evaporación. El secado se efectúa por evaporación de agua de la superficie saturada del sólido a través de la película estancada de aire localizada sobre éste. Cuando esta superficie empieza a perder el 100 % de saturación, la velocidad de secado disminuye. El agua ligada empieza

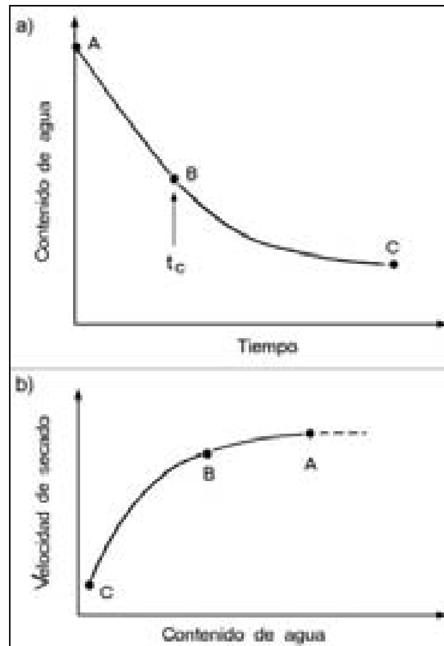


Figura 13.10: Curva de secado experimental. a) Variación del contenido de humedad con el tiempo de secado y b) Variación de la velocidad de secado con la humedad. Tomada de: Porter *et al.*, 1973. Reproducida con el permiso de McGraw-Hill Inc. Copyright ©1973. Todos los derechos reservados.

a evaporarse dentro del sólido y el vapor a difundirse a través del sólido hasta el aire. Este proceso es más lento y por lo tanto retarda la velocidad de secado. Debido a la situación descrita anteriormente, el tiempo de secado de un proceso debe ser calculado sumando los tiempos de los periodos de secado constante y de secado decreciente.

Velocidad de secado constante Cuando el calor de evaporación en el periodo de velocidad de secado constante es proporcionado por aire caliente, se establece un equilibrio dinámico entre la velocidad de transferencia de calor del aire al sólido y la velocidad de evaporación. Bajo estas condiciones la superficie del sólido alcanza la temperatura de saturación adiabática o temperatura de bulbo húmedo.

De acuerdo a la Figura 13.11 la velocidad de transferencia convectiva de calor q (energía/tiempo) está dada por:

$$q = \mathsf{h}A(T - T_i) \tag{13.17}$$

donde:

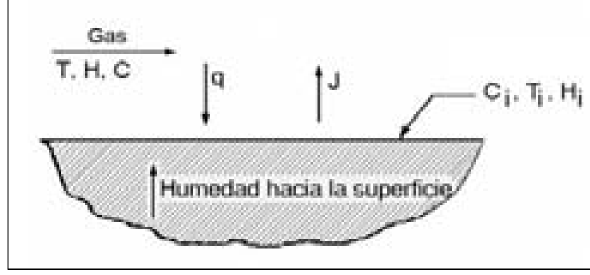


Figura 13.11: Transferencia convectiva de calor.

h: Coeficiente de transferencia de calor entre la película estancada de aire sobre la superficie del sólido y ésta (análogo a los coeficientes de transferencia de masa). [cal/ $\left(L^2 -^o -t\right)$].

A: Área expuesta al secado. [L^2].

T: Temperatura en el seno del aire. [°].

T_i: Temperatura en la superficie del sólido. [°].

El flux másico de agua puede ser expresado como:

$$J = k(C_i - C) \tag{13.18}$$

$$J = k\rho^{'}(H_i - H) \tag{13.19}$$

donde:

J: Flux de agua. [$M/\left(L^2 - t\right)$].

C_i: Concentración de agua en la superficie del sólido. [M/L^3].

C: Concentración de agua en el seno del aire. [M/L^3].

k: Coeficiente de transferencia de masa en la película estancada de aire sobre el sólido. [L/t].

$\rho^{'}$: Densidad de aire seco. [kg aire seco/$\left(L^3\text{de mezcla}\right)$].

$\rho^{'}$: $1/V_H$

El balance de agua en el sistema puede expresarse como:

$$m\frac{dW}{dt} = -JA \tag{13.20}$$

donde m es la masa de sólido seco utilizado y W la humedad del sólido.

Combinando las ecuaciones (13.19) y (13.20) se obtiene:

$$\frac{dW}{dt} = -\left(\frac{k\rho' A}{m}\right)(H_i - H) \tag{13.21}$$

El resultado anterior es difícil de utilizar debido a que generalmente las humedades no son medidas directamente. Entonces las humedades de la ecuación (13.21) se expresan en función de temperaturas combinando esa ecuación con el balance de energía.

En un proceso adiabático la transferencia de calor del aire al sólido es igual al total del calor latente de evaporación, de tal manera que:

Calor transferido = (Calor latente de evaporación) (Masa evaporada),

$$q = (\lambda)(JA) \tag{13.22}$$

Combiando las ecuaciones (13.17), (13.21) y (13.22) se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{dW}{dt} = -\left(\frac{\mathsf{h}A}{m\lambda}\right)(T - T_i) \tag{13.23}$$

La ecuación anterior es equivalente a la ecuación (13.21), pero está expresada en función de dos temperaturas fácilmente medibles: la temperatura de bulbo seco del aire T y la temperatura de saturación adiabática o temperatura de bulbo húmedo T_i.

Se puede calcular el tiempo de secado en el periodo de velocidad de secado constante integrando la ecuación (13.23) entre los límites siguientes:

$$t = 0 \qquad\qquad W = W_o$$

$$t = t_c \qquad\qquad W = W_c$$

obteniéndose:

$$t_c = \left[\frac{m\lambda}{\mathsf{h}A(T - T_i)}\right](W_o - W_c) \tag{13.24}$$

donde t_c es el tiempo para alcanzar la humedad crítica del sólido, que es la humedad a la cual termina el periodo de velocidad de secado constante.

Para el cálculo de t_c es necesario calcular h. Este coeficiente depende de la geometría del secador.

En el caso de secado con flujo de aire paralelo a la superficie de un sólido y una temperatura entre $45 - 150$ °C, el coeficiente de transferencia de calor puede ser evaluado con la ecuación,

$$\mathsf{h} = 0.0204\ G^{0.8} \tag{13.25}$$

donde:

G: Flux másico de aire. [kg/ $\left(\mathrm{m}^2 - \mathrm{h}\right)$].

h: Coeficiente de transferencia calor. [W/ $\left(\mathrm{m}^2 - {}^\circ\mathrm{K}\right)$].

En el caso de gases en flujo turbulento y sistemas aire-agua, también puede ser utilizada la analogía de Reynolds la cual establece una relación directa entre el coeficiente de transferencia de masa y el coeficiente de transferencia calor de la siguiente forma:

$$k = \frac{\mathsf{h}}{\rho C_P} \tag{13.26}$$

donde:

k: Coeficiente de transferencia de masa de la ecuación (13.18).

ρ: Densidad másica total del gas.

C_P: Capacidad calorífica. [cal/$M - {}^\circ$].

La ecuación (13.24) puede ser utilizada en forma combinada con la ecuación (13.25) o con la (13.26).

Velocidad de secado decreciente En el periodo de secado de velocidad constante generalmente se evapora la mayor parte del agua contenida en el sólido, pero puede implicar sólo una pequeña fracción del tiempo total de secado. Por otro lado, el periodo de velocidad de secado decreciente puede involucrar una evaporación de menos agua pero una mayor fracción del tiempo total de secado.

En el periodo de velocidad de secado decreciente la evaporación del agua (ligada) es más difícil, la velocidad de evaporación depende de mecanismos como: a) difusión del agua líquida en materiales homogéneos continuos, b) difusión del vapor de agua en materiales porosos o granulares, c) flujo capilar en sólidos porosos o granualares, d) flujo por gravedad en materiales granulares y e) flujo causado por contracción del sólido. Uno de estos mecanismos es generalmente el dominante, no obstante que varios de ellos puedan ocurrir simultáneamente.

Modelo lineal El análisis detallado del periodo de velocidad de secado decreciente es complejo y su descripción se realiza en forma aproximada. Uno de los modelos más sencillos para describir este periodo establece una relación lineal de la velocidad de secado con la humedad, de la siguiente forma:

$$\frac{dW}{dt} = -aW \tag{13.27}$$

donde a es una constante.

La ecuación (13.27) puede integrarse entre los límites:

$$t = t_c \qquad\qquad W = W_c$$

$$t = t \qquad\qquad W = W$$

obteniéndose la ecuación siguiente:

$$t - t_c = \frac{1}{a} \ln \left(\frac{W_c}{W} \right) \tag{13.28}$$

Tiempo de secado El tiempo total de una operación de secado puede calcularse sumando las ecuaciones (13.24) y (13.28):

$$t = \left[\frac{m\lambda}{\mathsf{h}A(T - T_i)} \right] (W_o - W_c) + \frac{1}{a} \ln \left(\frac{W_c}{W} \right) \tag{13.29}$$

En el diseño de secadores el cálculo del tiempo de secado permite su dimensionamiento adecuado. En el caso de los secadores por aspersión, el tiempo de secado debe ser menor al tiempo que dura la partícula en alcanzar la pared del secador, de tal manera que cuando esto ocurra la partícula ya esté seca y deslice suavemente por la pared del secador. Es decir, el tiempo de secado determina el diámetro del secador (Oakley, 2004).

Ejemplo 13.9. Secado en la región de velocidad constante.

Un material granular insoluble se va a secar en una charola de $45.7 \times 45.7 \times 2.54$ cm. El material ocupa completamente la charola y se puede considerar que los lados y el fondo de la bandeja están aislados, de tal manera que el calor sólo se transmite por convección desde una corriente de aire que fluye paralela a la superficie a una velocidad $\upsilon = 6.1$ m/s. El aire está a una temperatura de 65.6 °C y tiene una humedad de 0.01 kg de agua/kg de aire seco.

Se pide: Estimar la velocidad de secado del sólido.

Solución:

Para el cálculo de la velocidad de secado se utiliza la ecuación (13.23):

$$\frac{m}{A} \frac{dW}{dt} = -\frac{\mathsf{h}}{\lambda}(T - T_i)$$

El empleo de esta ecuación requiere calcular T_i, h y λ.

a) Cálculo de T_i.

Para una humedad de $H = 0.01$ agua/kg de aire seco y una temperatura de bulbo seco de 65.6 °C, mediante la carta psicométrica y utilizando la línea de saturación adiabática se puede encontrar,

$$T_i = 28.9^oC$$

b) Cálculo de h.

Se puede utilizar la ecuación (13.25) con $G = \upsilon\rho$.

Para el cálculo de la densidad del aire se necesita calcular el volumen húmedo del aire. Utilizando la ecuación (13.10),

$$V_H = (0.00283 + 0.00456H)(T + 273) \quad \left[\frac{\text{m}^3 \text{ mezcla}}{\text{kg aire seco}}\right]$$
$$V_H = (0.00283 + 0.00456 \times 0.01)(65.6 + 273) \quad \left[\frac{\text{m}^3 \text{ mezcla}}{\text{kg aire seco}}\right]$$
$$V_H = 0.974 \frac{\text{m}^3 \text{ mezcla}}{\text{kg aire seco}}$$

La densidad de 1.0 kg de aire seco y 0.01 kg de agua acompañante es:

$$\rho = \frac{1 + 0.01}{0.974} = 1.037 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$$

El flujo másico es:

$$G = 6.1 \frac{\text{m}}{\text{s}} \times 1.037 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \times \frac{3600 \text{ s}}{\text{h}} = 22,770 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2 - \text{h}}$$

El coeficiente de transferencia de calor se puede calcular con la ecuación (13.25):

$$\mathsf{h} = 0.0204 \times (22,770)^{0.8}$$
$$\mathsf{h} = 62.45 \frac{W}{\text{m}^2 - {}^\circ\text{K}}$$

c) Cálculo de λ.

El calor de evaporación se obtiene de tablas de vapor a $T_i = 28.9$ °C, este valor es:

$$\lambda = 2,433 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}}$$

y de acuerdo a la ecuación (13.23),

$$\frac{m}{A}\frac{dW}{dt} = -\frac{62.45 \frac{\text{W}}{\text{m}^2 - {}^\circ\text{K}} \times \frac{\frac{\text{J}}{\text{s}}}{\text{W}} \times \frac{3600 \text{ s}}{\text{h}} \times (65.6 - 28.9) \; {}^\circ\text{K}}{2,433 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} \times \frac{1000 \text{ J}}{\text{kJ}}}$$

$$\frac{m}{A}\frac{dW}{dt} = 3.39 \frac{\text{kg agua}}{\text{m}^2 - \text{h}}$$

el área de transferencia de acuerdo a las dimensiones de la charola es:

$$A = 0.457 \text{ m} \times 0.457 \text{ m} = 0.209 \text{ m}^2$$

de tal manera que la velocidad de secado es:

$$m\frac{dW}{dt} = 0.709 \frac{\text{kg agua}}{\text{h}}$$

Secado de sólidos no porosos El modelo teórico más utilizado para describir todo el fenómeno de secado de sólidos no porosos es el modelo difusivo, que es un método de parámetros agrupados que reduce la complejidad de la descripción de la cinética de secado a un coeficiente de difusión efectivo (el modelo también ha sido utilizado para describir sólo la fase de velocidad de secado decreciente) (Schlunder, 2004).

Cuando se supone un mecanismo unidireccional de transporte en una placa (slab) en la direccción y, con una difusividad efectiva constante D_{ef}; la difusión de agua líquida a través de la matriz sólida no porosa sujeta al proceso de secado, puede ser descrita por la segunda Ley de Fick de la difusión. En términos de la humedad del sólido se expresa como:

$$\frac{\partial W}{\partial t} = D_{ef}\frac{\partial^2 W}{\partial y^2} \tag{13.30}$$

La solución analítica de esta ecuación para secado es (Crank, 1975):

$$\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = \frac{8}{\pi^2}\sum_{i=0}^{\infty}\frac{1}{(2i+1)^2}\exp\left[-\frac{(2i+1)^2\pi^2}{4L^2}D_{ef}t\right] \tag{13.31}$$

donde W_e es la humedad de equilibrio, W_0 es la humedad inicial y L es el espesor de la placa cuando el secado es por una cara de la placa y L es la mitad del espesor de la placa para secado por las dos caras.

Para periodos largos de tiempo de secado y $4D_{ef}t/L^2 > 0.1$, el primer término de la serie anterior es una buena aproximación de la solución, entonces:

$$\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = \frac{8}{\pi^2}\exp\left[-\frac{\pi^2}{4L^2}D_{ef}t\right] \tag{13.32}$$

Diferenciando la ecuación anterior se obtiene la expresión para la velocidad de secado siguiente:

$$\frac{dW}{dt} = -\frac{\pi^2 D_{ef}}{4L^2}(W - W_e) \tag{13.33}$$

Ejemplo 13.10. Secado de pimientos rojos. En el estudio de la cinética de secado con aire de placas (slabs) de pimientos rojos y de la cinética de descomposición del ácido ascórbico, se han utilizado los modelos siguientes (Di Scala y Crapiste, 2008; Turhan y Turhan, 1997):

Modelo de la cinética de secado:

$$\frac{dW}{dt} = -\frac{\pi^2 D_{ef}}{4L^2}(W - W_e)$$

El efecto de la temperatura sobre el coeficiente de difusión se describe mediante una ecuación tipo Arrhenius:

$$D_{ef} = D_{0ef} \exp\left(-\frac{E_d}{RT_a}\right)$$

Modelo de variación de la temperatura del producto:

Para describir el cambio de la temperatura en las placas experimentales de pimiento rojo se utiliza el siguiente balance de energía:

$$\frac{dT_S}{dt} = \frac{a_V}{\rho_S C p_s}\left[-J\Delta H_V + h_g\left(T_a - T_s\right)\right]$$

El cálculo del flux de agua se realiza utilizando la siguiente igualdad:

$$\frac{dW}{dt} = -\frac{JA}{m} = -\frac{Ja_V}{\rho_S}$$

El modelo considera la variación de las propiedades del producto con la humedad del producto.

La variación de la densidad del pimiento rojo está dada por:

$$\rho_S = 2798 \exp\left[-15.83\left(\frac{W}{W_0}\right)\right] + 845.2 \exp\left[0.125\left(\frac{W}{W_0}\right)\right] \quad \text{para} \quad \frac{W}{W_0} \geq 0.1$$
$$\rho_S = 1138 \exp\left[2.33\left(\frac{W}{W_0}\right)\right] \quad \text{para} \quad \frac{W}{W_0} < 0.1$$

La área específica de transferencia de calor por:

$$a_V = a_{V0}\left[5.149 - 18.813\left(\frac{W}{W_0}\right) + 28.684\left(\frac{W}{W_0}\right)^2 - 14.02\left(\frac{W}{W_0}\right)^3\right]$$

El calor específico del producto varía de acuerdo a:

$$Cp_s = 815.4 + 3382\left(\frac{W}{1+W}\right)$$

El coeficiente de transferencia de calor:

$$h_g = h_{g0}\left(\frac{a_{V0}}{a_{V0}}\right)^{0.36}$$

Modelo de la cinética de descomposición del ácido ascórbico:

Se supone una cinética de descomposición del ácido ascórbico de pseudo primer orden de la forma:

$$\frac{dA_a}{dt} = -k_a A_a$$

donde:

$$k_a = k_{0a} \exp\left(-\frac{E_{aa}}{RT_s}\right)$$

$$k_{0a} = K_{1a} W^{K_{2a}}$$

$$\frac{E_{aa}}{R} = K_{3a} + K_{4a} W$$

Los parámetros experimentales del sistema se presentan en la tabla siguiente:

Parámetro	**Símbolo**	**Valor**
Conc. ácido ascórbico	A_{a0}	0.029531 kg asc/kg prod seco
Relación área/volumen	a_{v0}	200 m^{-1}
Cte. de dif. efectiva	D_{0ef}	2.6×10^{-4} m^2/s
Energía activ. de difusión	E_d	33,830 J/mol
Coef. de transf. de calor	h_{g0}	57.3 $W/m^2 - °K$
Ctes. reacción ascórbico	$K_{1a}, K_{2a},$	1.820, 0.590,
Ctes. reacción ascórbico	K_{3a} *y* K_{4a}	3144 y 8.99
Dimensión de placas		$0.02 \times 0.02 \times 0.005$ m
Cte. de los gases ideales	R	8.314 J/mol−°K
Temperatura del aire	T_a	60 °C
Temp. inicial del producto	T_{s0}	25 °C
Humedad en equilibrio	W_e	0.0058 kg agua/kg prod seco
Humedad inicial	W_0	12.16 kg agua/kg prod seco
Calor de vaporización	ΔH_V	2.36×10^6 J/kg

Se pide: Escribir un programa MATLAB para graficar la variación de la humedad y el contenido de ácido ascórbico en las placas de pimiento rojo.

Solución:

En la Figura 13.12 se presenta el programa MATLAB para la solución del ejemplo. Las gráficas de las cinéticas se presentan en la Figura 13.13.

Secado de suspensiones por aspersión: balances y dimensionamiento

El diseño de secadores por aspersión requiere del análisis global del proceso de secado que involucra: a) la atomización de la suspensión, b) el mezclado de las gotas con el gas de secado, c) el secado (cinética y tiempo de residencia) y d) la separación de los sólidos secos del gas de salida (Thybo *et al.*, 2008; Wang y Langrish, 2009).

En los secadores por aspersión el tiempo de residencia del aire en la cámara de secado es un factor de diseño clave. Se puede suponer que el tiempo de residencia mínimo del producto en el secador es igual al tiempo de residencia del aire. En el caso de productos sensibles al calor, el tiempo promedio de residencia se recomienda sea menor a 35 s. A su vez, este tiempo debe ser menor al tiempo que dura la gota en alcazar la pared del recipiente.

```
%--------------------------------------------------------------
% Bioseparaciones 2da Edición
% Ejemplo 13.10  Secado de sólido no poroso.
% Nombre del archivo ejemplo_13_10
clear; clc; clf
%--------------------------------------------------------------
%                             Entrada de datos
%--------------------------------------------------------------
% Paso de constantes a la función ec_modelo
global def l we w0 av0 hg0 dhv tea K1a K2a K3a K4a
%==============================================================
% Datos
dDef=2.6e-4 % m2/s
l=5e-3 %m
Ed=22820 % J/mol
r=8.314 %J/mol-°K
tea=273+60  ; tes0=25+273 % °K
aa0=2.9531e-2; we=0.0050 ; w0=12.14 %kg/kg;
av0=200 %m-1
hg0=57.3 %J/m2-s-°K
dhv=2360000 %J/kg
K1a=1.020; K2a=0.50; K3a=3141;K4a= 0.99
y0=[w0 tes0 aa0]
tfin=21000
%==============================================================
%                       Cálculos
%==============================================================
def=dDef*exp(-Ed/(r*tes0))
% Llamado a la función e integración -------------
     [t,y]=ode45('ec_modelo',[0:tfin],y0);
%==============================================================
%                          Salida de resultados
%--------------------------------------------------------------
w=y(:,1); aa=y(:,3)/aa0; wad=(w-we)/(w0-we)
plot(t,wad);
xlabel('t (s)'); ylabel('(W-We)/(W0-We)')
figure
plot(t,aa);
xlabel('t (s)'); ylabel('Retención de A. Ascórbico')
axis([0 20000 0 1])
%==============================================================
%                          Fin del programa
```

```
  function dydt = ec_modelo(t,y)
%==============================================================
% Modelo de secado
%--------------------------------------------------------------

% Llamar a parámetros
 global def l we w0 av0 hg0 dhv tea K1a K2a K3a K4a
 w=y(1)
 tes=y(2)
 aa=y(3)
% Cinética de secado
dwdt=-((pi^2)*def/(4*l^2))*(w-we);
%==============================================================
% Modelo de temperatura en el sólido
%==============================================================
if(w/w0)>=0.1
rhos=2790*exp(-13.83*(w/w0))+ 845.2*exp(0.125*(w/w0))
else
rhos=1138*exp(2.33*(w/w0))
end
av=av0*(5.149-10.013*(w/w0)+10.494*(w/w0)^2-14.02*(w/w0)^3)
j=-(rhos/av)*dwdt
cps=(815.4+3302*(w/(1+w)))*1000
hg=hg0*(av/av0)^(0.36)
dtesdt=(av/(rhos*cps))*(-j*dhv+hg*(tea-tes))
%==============================================================
% Modelo de descomposición Ac. ascórbico
%==============================================================
k0a=K1a*w^(K2a)
eaa_r=K3a+K4a*w
ka=k0a*exp(-eaa_r/tes)
daadt=-ka*aa
%--------------------------------------------------------------
dydt=[dwdt dtesdt daadt]'
```

Figura 13.12: Programa MATLAB para la solución del Ejemplo 13.10.

Existen varios enfoques ingenieriles para el diseño de secadores por aspersión (Oakley, 2004). Un enfoque práctico de diseño se basa en el tiempo de residencia del aire en el secador y en el uso de balances de masa y energía. Esto permite desarrollar el diseño conceptual para estimar las dimensiones críticas de los equipos.

Una vez fijado el tiempo de residencia del aire, t, en el secador por aspersión, se calcula mediante balances el flujo volumétrico de la mezcla aire-agua G_V. Con estos dos valores se determina el volumen de la cámara del secador ($V = G_V t$).

Las dimensiones de la cámara dependen del tipo específico de secador. En el caso de secadores con aspersores tipo disco giratorio la relación de esbeltez H/D recomendable es de (0.6-1.0):1.0, para asegurar un adecuado tiempo de viaje de las gotas que evite incrustamientos en la pared del secador.

Ejemplo 13.11. Secado de un antibiótico.

Se requiere utilizar un secador por aspersión en un arreglo como el que se muestra en la Figura 13.14, para secar una solución de antibiótico que contiene 25 % (kg/kg) de sólidos y se encuentra a una temperatura de 20 °C. El aire que entra al secador es tomado de la atmósfera a 15 °C y con 50 % de humedad. Se

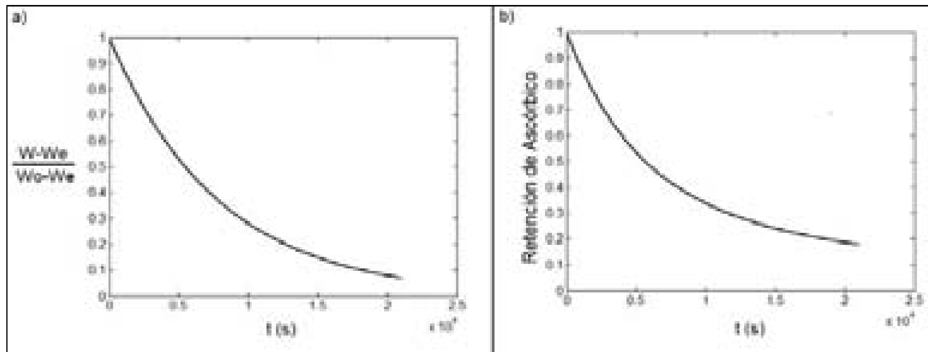


Figura 13.13: Cinéticas de secado de pimiento rojo. a) Curva de secado y b) Retención de ácido ascórbico.

calienta hasta 150 °C en un intercambiador de calor utilizando vapor en forma indirecta. El aire de salida del sistema tiene una temperatura de 75 °C.

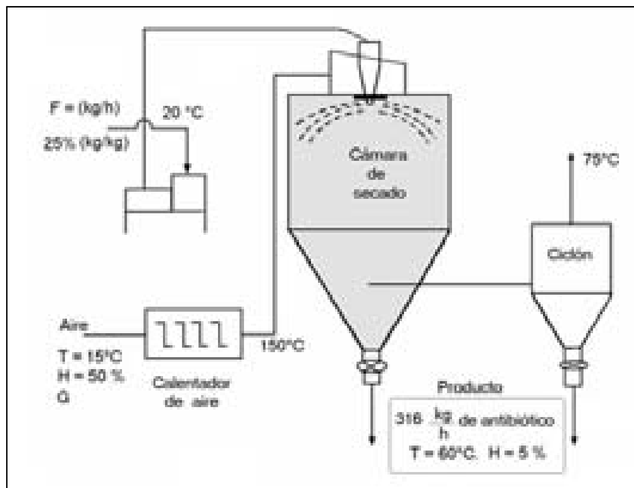


Figura 13.14: Esquema del sistema de secado por aspersión del Ejemplo 13.11.

La capacidad calorífica de los sólidos es de 0.4 kcal/ (kg − °C) y la temperatura de referencia es de 0 °C. En el proceso se requiere producir 316 kg/h de antibiótico con una humedad del 5 % y una temperatura de 60 °C.

Se pide estimar:

a) El flujo másico de alimentación.

b) La cantidad de masa de agua evaporada en el proceso.

c) El flujo másico de aire necesario y la humedad de aire a la salida.

d) El flujo másico de vapor a la salida.

e) Flujo volumétrico de aire húmedo
f) Las dimensiones de la cámara de secado
Solución:
a) El flujo de alimentación puede ser calculado mediante un balance de sólidos.

$$\text{Entrada de sólidos} = \text{Salida de sólidos}$$

$$\begin{aligned} F \times 0.25 \, \frac{\text{kg sólidos}}{\text{kg totales}} &= 316 \, \frac{\text{kg}}{\text{h}} \times 0.95 \, \frac{\text{kg sólidos}}{\text{kg totales}} \\ F &= 1,200 \, \frac{\text{kg}}{\text{h}} \end{aligned}$$

b) La cantidad de agua evaporada puede calcularse mediante un balance de agua en los sólidos.

$$\begin{aligned} \text{Agua evaporada} &= \text{Agua en la alimentación} - \text{Agua en el producto} \\ \text{Agua evaporada} &= 1200 \, \frac{\text{kg}}{\text{h}} \times 0.75 \, \frac{\text{kg agua}}{\text{kg}} \\ &\quad -316 \, \frac{\text{kg}}{\text{h}} \times 0.05 \, \frac{\text{kg agua}}{\text{kg}} \\ \text{Agua evaporada} &= 884 \, \frac{\text{kg}}{\text{h}} \end{aligned}$$

c) La humedad del aire a la salida y el flujo de aire, pueden calcularse mediante un balance de masa y un balance de energía.
El balance de masa se pude escribir como:

$$G(H_2 - H_1) = 884 \, \frac{\text{kg agua}}{\text{h}}$$

La humedad H_1 del aire a la entrada puede encontrarse en la carta psicométrica de la Figura 13.2,

$$H_1 = 0.005 \, \frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}}$$

El balance de energía está dado por:

$$[\text{Entalpia de la alimentación}] + [\text{Entalpia del aire a la entrada}] =$$

$$[\text{Entalpia del producto}] + [\text{Entalpia del aire a la salida}]$$

La entalpia de la alimentación está dada por:

$$\begin{aligned} & 1200\ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \times 0.25\ \frac{\text{kg sólido}}{\text{kg}} \times 0.4\ \frac{\text{kcal}}{\text{kg sólido} - {}^\circ\text{C}} \times (15-0)\ {}^\circ\text{C} + \\ & 1200\ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \times 0.75\ \frac{\text{kg agua}}{\text{kg}} \times 1.0\ \frac{\text{kcal}}{\text{kg agua} - {}^\circ\text{C}} \times (15-0)\ {}^\circ\text{C} \\ = \ & 15,300\ \frac{\text{kcal}}{\text{h}} \end{aligned}$$

La entalpia del producto es:

$$\begin{aligned} & 316\ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \times 0.95\ \frac{\text{kg sólido}}{\text{kg}} \times 0.4\ \frac{\text{kcal}}{\text{kg sólido} - {}^\circ\text{C}} \times (60-0)\ {}^\circ\text{C} + \\ & 316\ \frac{\text{kg}}{\text{h}} \times 0.05\ \frac{\text{kg agua}}{\text{kg}} \times 1.0\ \frac{\text{kcal}}{\text{kg agua} - {}^\circ\text{C}} \times (60-0)\ {}^\circ\text{C} \\ = \ & 8,152.8\ \frac{\text{kcal}}{\text{h}} \end{aligned}$$

La entalpia del aire a la entrada puede calcularse utilizando la ecuación (13.12),

$$\begin{aligned} & \left(G\ \frac{kg\ \text{ aire seco}}{h}\right) \{[1.005 + (1.884)(0.005)]\,(150)\ + \\ & (2502)(0.005)\} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{kg aire seco}}\right) \left(\frac{\text{kcal}}{4.187\ \text{kJ}}\right) \\ = \ & 39.33\ G \quad \left[\frac{\text{kcal}}{\text{h}}\right] \end{aligned}$$

de igual manera la entalpia de aire a la salida es:

$$\begin{aligned} & \left(G\ \frac{\text{kg aire seco}}{\text{h}}\right) \{[1.005 + (1.884)(H_2)]\,(75) + \\ & (2502)(H_2)\} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{kg aire seco}}\right) \left(\frac{\text{kcal}}{4.187\ \text{kJ}}\right) \\ = \ & 18\ G + 631.3\ GH_2 \quad \left[\frac{\text{kcal}}{\text{h}}\right] \end{aligned}$$

El balance de energía puede ser expresado como:

$$(15,300) + (39.33\ G) = (8152.8) + (18\ G + 631.3\ GH_2) \quad \left[\frac{\text{kcal}}{\text{h}}\right]$$

resolviendo simultáneamente las ecuaciones de balance de masa y energía se obtiene:

$$G = 30,320\ \frac{\text{kg aire seco}}{\text{h}}; \quad H_2 = 0.0341\ \frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}}$$

d) Flujo de vapor

$$FV = GH_2 = 30,320\ \frac{\text{kg aire seco}}{\text{h}} \times 0.0341\ \frac{\text{kg agua}}{\text{kg aire seco}} = 1,034\ \frac{\text{kg agua}}{\text{h}}$$

e) Flujo volumétrico de aire húmedo.

Para el cálculo del flujo volumétrico de la mezcla es necesario calcular primero su peso molecular promedio:

$$M_{prom} = \frac{1.0341}{\dfrac{0.0341}{18} + \dfrac{1}{28.9}} = 28.33\ \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

La densidad de la mezcla a la salida es:

$$\rho_{\text{sal}} = \frac{PM}{RT} = \frac{1\ \text{atm} \times 28.33\ \dfrac{\text{g}}{\text{mol}} \times \dfrac{\text{kg}}{10^3\ \text{g}}}{82. \times 10^{-6}\ \dfrac{\text{atm} - \text{m}^3}{\text{mol} - {}^\circ\text{K}} \times 348\ {}^\circ\text{K}} = 0.993\ \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$$

entonces el flujo volumétrico de aire húmedo es:

$$G_V = \frac{1,034\ \dfrac{\text{kg agua}}{\text{h}} + 30,320\ \dfrac{\text{kg aire seco}}{\text{h}}}{0.993\ \dfrac{\text{kg}}{\text{m}^3}} = 31,575\ \frac{\text{m}^3}{\text{h}}$$

f) Dimensiones de la cámara de secado considerando un tiempo de residencia de 35 s.

$$V = G_V t = \left(31575\ \frac{m^3}{\text{h}}\right) \times 35\ \text{s} \times \frac{\text{h}}{3600\ \text{s}} = 307\ \text{m}^3$$

Utilizando una relación de esbeltez de $H/D = 0.8$ se tiene:

$$V = \frac{\pi \times D^2}{4} \times H = \frac{\pi \times D^2}{4} \times 0.8D = 307\ \text{m}^3$$

De tal manera que:

$$D = 7.87\ \text{m}; \quad H = 6.3\ \text{m}$$

El diámetro es mayor al recomendado para secar partículas de tamaño relativamente grande del orden de 100 μm.

13.4.2. Diseño de Secadores no Adiabáticos: Calor conductivo

En los secadores no adiabáticos la velocidad de secado depende de la velocidad de transferencia de calor a través de una pared, hacia el sólido que se desea secar. Este tipo de secado se efectúa al vacío para remover rápidamente el vapor formado. La velocidad de secado debe ser tal que evite la formación de zonas de sobrecalentamiento que dañen el material.

Dos tipos de secadores no adiabáticos son de particular importancia: a) secadores no adiabáticos de torta estacionaria y b) secadores no adiabáticos giratorios.

Secado de tortas estacionarias

Para calcular el tiempo de secado de sólidos en charolas o en liofilizadores se puede utilizar un modelo aproximado. De acuerdo con la Figura 13.15, el calor para producir la evaporación (o la sublimación) del agua, se transfiere por la pared del recipiente y a través del sólido. Este calor permite que el agua se evapore a partir de una superficie móvil localizada a una distancia Z. Arriba de esta superficie el sólido está seco y abajo de ella el sólido se encuentra húmedo. Conforme el sólido se seca el frente desciende, aumentando la zona seca. Este modelo implica que tanto el agua líquida ligada como la no ligada, no se transportan en el interior del sólido.

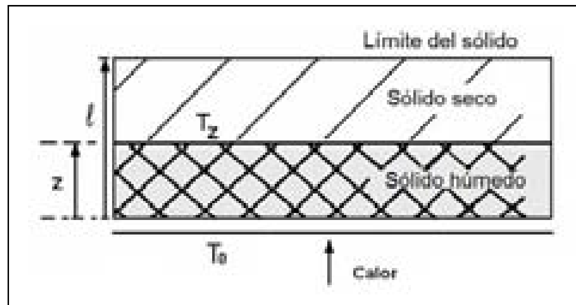


Figura 13.15: Diagrama del secado de una torta estacionaria.

De acuerdo con el modelo el secado del sólido se logra cuando la distancia Z es igual a cero. El tiempo para lograr lo anterior se puede obtener realizando balances de energía.

Suponiendo que la velocidad de secado es lenta, de tal manera que el calor transferido de la pared hacia el sólido es igual al valor de estado estacionario (constante) dado por:

$$q = \mathsf{h}A(T_o - T_Z) \tag{13.34}$$

que para el caso de sólidos puede ser expresado como:

$$q = \frac{\kappa}{Z} A(T_o - T_Z) \tag{13.35}$$

donde:

h: Coeficiente de transferencia de masa. [cal/ $\left(L^2 - t - {}^\circ\right)$].

κ: Conductividad térmica. [cal/ $(L - t - {}^\circ)$].

T_o: Temperatura en la base de la charola. [°].

T_Z: Temperatura en el frente de secado. [°].

q: Flujo de calor. [cal/t].

El calor transferido puede ser relacionado con el movimiento del frente de secado por medio del balance de calor en estado estacionario:

$$\text{Calor transferido} = (\text{Agua evaporada})(\text{Calor de evaporación})$$

En forma de ecuación:

$$q = \lambda \rho_o \frac{d(AZ)}{dt} \tag{13.36}$$

donde:

A: Área de la sección transversal de la charola. [L^2].

λ: Calor de evaporación. [cal/M].

ρ_o: Masa de agua ligada y no ligada por volumen de sólido mojado. [M/L^3].

Combinando las ecuaciones (13.35) y (13.36) e integrando entre los límites,

$$t = 0 \qquad Z = l$$

$$t = t \qquad Z = Z$$

se obtiene:

$$Z^2 = l^2 - \left[\frac{2\kappa(T_o - T_Z)}{\rho_o \lambda}\right] t \tag{13.37}$$

Al final de la operación cuando $t = t_f$, todo el sólido está seco y $Z = 0$, la ecuación (13.37) se puede expresar como:

$$t_f = \frac{1}{2}\left[\frac{\rho_o \lambda l^2}{\kappa(T_o - T_Z)}\right] \tag{13.38}$$

Este resultado indica que el espesor de la torta es un factor importante en el tiempo de secado. Si el espesor se dobla el tiempo de secado se incrementa cuatro veces.

La ecuación (13.37) también puede utilizarse para calcular la evolución del secado con el tiempo, como porcentaje o fracción de la zona seca Θ, expresándose de la siguiente manera:

$$\Theta = \frac{Z}{l} = \left[1 - \left(\frac{2\kappa(T_o - T_Z)}{\rho_o \lambda l^2}\right) t\right]^{\frac{1}{2}} \tag{13.39}$$

El análisis anterior es sencillo y útil como punto de partida en el diseño de secadores no adiabáticos.

Secado giratorio al vacío

La descripción del secado en equipos giratorios como los secadores de tipo tambor o los de doble cono, es más compleja. La carga de material se mueve constantemente, de tal manera que las partículas contactan la superficie caliente en forma intermitente y en repetidas veces, durante su residencia en el equipo de secado.

El diseño de este tipo de secadores se basa en determinaciones experimentales a nivel piloto. El escalamiento se realiza considerando que el producto del tiempo de secado por el área de secado por unidad de volumen se mantiene constante al cambiar de escala, es decir:

$$\left(\frac{t_o A}{V}\right)_{Piloto} = \left(\frac{t_o A}{V}\right)_{Industrial} \tag{13.40}$$

Esta ecuación supone que las condiciones a nivel piloto son iguales a las de nivel industrial: temperaturas, niveles de vacío y el porcentaje del volumen total que es ocupado por el sólido (50-65 %).

13.5. Sumario

El secado es una operación empleada en la preparación final de los bioproductos. Consiste en una reducción del contenido de humedad de los sólidos con el propósito de mejorar su estabilidad, reducir su volumen y preservar su actividad.

Los métodos para efectuar una operación de secado se clasifican en adiabáticos y no adiabáticos. En el secado adiabático se agrega aire caliente directamente sobre el material que se desea secar. El secado no adiabático se realiza mediante un calentamiento indirecto del material de interés.

Existen diversos equipos de secado, los cuales se pueden clasificar mediante la forma en que se realiza el secado. Los secadores adiabáticos más utilizados son el de aspersión, el secador instantáneo y el de lecho fluidizado. Entre los no

adiabáticos se pueden citar los secadores tipo charola, de doble cono, tambor rotatorio y los liofilizadores.

El diseño de los secadores está basado en una combinación de la teoría de secado y datos experimentales obtenidos directamente con el material de interés.

13.6. Problemas

13.1. **Humedad de aire.** El aire de una habitación tiene una humedad H de 0.021 kg de agua/ kg aire seco, se encuentra a 32.2 °C y a una atmósfera de presión.

Se pide calcular:

a) El porcentaje de humedad del aire de la habitación.

b) El porcentaje de humedad relativa.

Resp. a) 67.5 % y b) 68.9 %.

13.2. Temperaturas para el cálculo de humedad. Una mezcla aire-vapor de agua tiene una temperatura de bulbo seco de 65.6 °C y una temperatura de bulbo húmedo de 32.2 °C.

Se **pide:** Calcular la humedad de la mezcla.

Resp. $H = 0.0175$ kg agua/kg aire seco

13.3. **Humedad de aire.** Se desea secar aire con temperatura de bulbo seco de 37.8 °C y temperatura de bulbo húmedo de 26.7 °C, enfriando primero a 15.6 °C para condensar vapor de agua y después calentándolo a 23.9 ^oC.

Se pide calcular:

a) La humedad y porcentaje de humedad iniciales.

b) La humedad y el porcentaje de humedad finales.

Resp. b) $H = 0.0115$ kg agua/kg aire seco. % $H = 60$ %

13.4. Secador de charola. Una torta de filtrado se coloca en una charola de $30.5 \times 30.5 \times 2.54$ cm. Se seca por la parte superior con aire cuya temperatura de bulbo húmedo es de 26.6 °C y su temperatura de bulbo seco es 48.9 °C. El aire fluye en forma paralela a la superficie con una velocidad de 45.75 m/min.

Se pide: Estimar el tiempo para pasar el sólido de una humedad inicial de 0.2 kg de agua/kg de sólido seco, hasta su humedad crítica de 0.09 kg de agua/kg sólido seco.

Resp. $t = 13.3$ h

13.5. Cinética de secado. En el secado de una muestra de 3.765 kg de un alimento, mediante un flujo de aire sobre la superficie superior de una charola de 0.186 m^2 de área, se obtuvieron los siguientes datos:

Tiempo (h)	**Peso** (kg)
0.0	4.944
0.4	4.885
0.8	4.808
1.4	4.699
2.2	4.554
3.0	4.404
4.2	4.241
5.0	4.150
7.0	4.019
9.0	3.978
12.0	3.955

Se pide:

a) Graficar los datos de humedad del sólido W contra el tiempo.

b) Obtener la velocidad de secado en cada punto y graficarla contra la humedad del sólido.

c) Estimar la velocidad de secado en el periodo de velocidad constante.

d) Estimar la humedad crítica.

e) Estimar la humedad de equilibrio.

f)Estimar el tiempo para disminuir la humedad del sólido de 0.25 a 0.09 kg/kg.

Resp. c) 0.996 kg/h$-$m^2, d) 0.17 kg/kg e) 0.05 kg/kg y f) 4.1 h.

13.7. Bibliografía

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W. **1988**. *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.* John Wiley and Sons. New York. 11, 307-333.

Brocklebank, M.P. **1990**. Downstream processing plant and equipment. En: *Separation Processes in Biotechnology.* Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 19, 617-740.

Claussen, I.C.; Ustad, T.S.; Strømmen, I.; Walde. P.M. **2007**. Atmospheric freeze drying-A review. *Drying Technology.* 25, 957-967.

Crank, J. **1975**. *The mathematics of diffusion* (2nd ed.). London. Oxford University Press. 347 p.

De Vivo, J. **1983**. Nonadiabatic drying. En: *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook.* Principles, Process Design, and Equipment. Vogel, H.C. (Ed.). Noyes Publications. New Jersey. 11, 317-330.

Di Scala, K.; Crapiste, G. **2008**. Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. *Food Sci. Tech.* 42, 789-795.

Gong, Z.; Mujumdar, A. **2008**. Software for design and analysis of drying systems. *Drying Technology.* 26, 884-894.

Katekawa, M.E.; Silva, M.A. **2006**. A review of drying models including shrinkage effects. *Drying Technology.* 24, 5-20.

Oakley, D.E. **2004**. Spray dryer modeling in theory and practice. *Drying technology.* 22, 1371-1402.

Prabakaran, G.; Hoti, S.L. **2007**. Optimization of spray-drying conditions for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* after downstream processing. *Biotech. Bioeng.* 100, 103-107.

Porter, H.F.; Mc Cormick, P.Y.; Lucas, R.L.; Wells, D.F. **1973**. Gas-solid systems. En: *Chemical Engineer's Handbook.* Perry, R.H. y Chilton C.H. (Eds.). 5th Ed. McGraw-Hill. New York. 20, 1-121.

Quinn, J.J. **1983**. Adiabatic drying. En: *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook.* Principles, Process Design, and Equipment. Vogel, H.C. (Ed.). Noyes Publications. New Jersey. 12, 331-362.

Schlunder, E.U. **2004**. Drying of porous material during the constant and the falling rate period: A critical review of existing hypotheses. *Drying Technology.* 22, 1517-1532.

Sloth, J.; Jørgensen, K.; Bach, P.; Jensen, A.D.; Kiil, S.; Dam-Johansen, K. **2009**. Spray drying of suspensions for pharma and bio products: Drying kinetics and morphology. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3657-3664.

Thybo, P.; Hovgaard, L.; Lindeløv, J.S.; Anders Brask, A.; Andersen, S.K. **2008**. Scaling up the spray drying process from pilot to production scale using an atomized droplet size criterion *Pharm. Research.* 25, 1610-1620.

Tsotsas, E.; Gnielinski, V.; Schluender, E. **2003**. Drying of solid materials. En: Bohnet, M. *Ullmannïs encyclopedia of industrial chemistry.* Vol. 11 : Diuretics to energy management in chemical industry. 6. Wiley-VCH. S. 47 - 82

Treybal, R.E. **1980**. *Operaciones de Transferencia de Masa.* McGraw-Hill. 2 ed. México. 12, 723-791.

Turhan, M.; Turhan, K. N.; Sahbaz, F. **1997**. Drying kinetics of red pepper. *J. Food Proc. Preservation.* 21, 209-223.

Wang, S.; Langrish, T. **2009**. A review of process simulations and the use of additives in spray drying. *Food Res. Int.* 42, 13-25.

Parte VI

Diseño del Bioproceso

En esta Parte V del libro en su Capítulo 14 se combina la información presentada en los capítulos anteriores para analizar en forma integral un bioproceso de interés. La metodología requiere considerar por un lado aspectos de mercado como el precio y la demanda específica del producto. Por otro lado, aspectos técnico-económicos como la producción anual, las dimensiones de los equipos, las necesidades de insumos, los costos asociados, la inversión proyectada y el impacto ambiental. Este enfoque ayuda a seleccionar el mejor diseño entre las alternativas técnicamente plausibles.

Capítulo 14

Análisis del Bioproceso

14.1. Introducción

El análisis de un bioproceso consiste en la evaluación y comparación de diagramas de flujos alternativos para la obtención del producto de interés, integrados por las operaciones unitarias seleccionadas durante la síntesis del bioproceso.

El diseño de un bioproceso puede desarrollarse a diferentes niveles de detalle que varían en su objetivo, precisión, costo y tiempo para efectuarse. El objetivo varía típicamente desde un estudio de factibilidad hasta uno de comercialización. La precisión aumenta con el grado de desarrollo del bioproceso desde la escala laboratorio hasta el nivel de planta piloto. El costo y el tiempo del estudio generalmente aumenta conforme el grado de precisión aumenta.

En este capítulo, en la sección 14.2, se presenta la metodología general del análisis de bioprocesos y los principales aspectos técnicos a considerar en este tipo de estudios. El uso de paquetes computacionales para el diseño de bioprocesos se describe en la sección 14.3. En la sección 14.4 se presenta un caso práctico sobre el uso de esta metodología.

14.2. Fundamentos

El diseño, desarrollo y evaluación económica de un bioproceso se basa en la demanda comercial o social del producto, su sustentabilidad y las especificaciones regulatorias que es necesario cumplir (Freitas *et al.*, 2009; Nfor *et al.*, 2008). Este tipo de trabajos precisan la integración de información y conocimiento de varias disciplinas ingenieriles y científicas (Fig. 14.1).

Un enfoque comúnmente utilizado para lograr esta integración consiste en: a) establecer la escala y modo de operación del bioproceso, b) desarrollar un modelo conceptual del bioproceso constituido por los submodelos biológico, físico y de costos, c) resolver los balances de masa y energía del bioproceso y d) realizar la evaluación económica y análisis de resultados correspondientes.

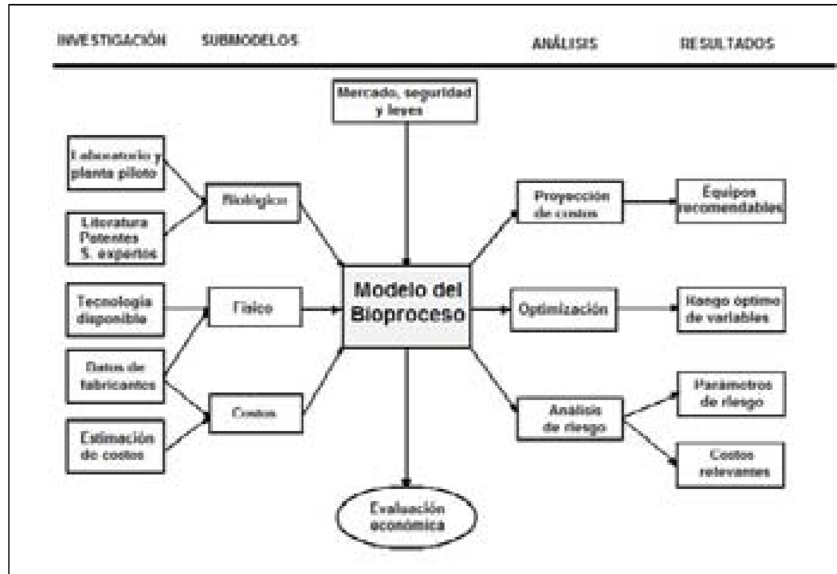


Figura 14.1: Análisis de bioprocesos. Integración de información y conocimientos para el diseño y evaluación de bioprocesos.

14.2.1. Escala y Modo de Operación

El volumen de producción o escala del bioproceso depende del mercado y de las características de producción. El mercado determina entre otras cosas el volumen de la demanda a cubrir. La producción se caracteriza por la productividad en el fermentador y el rendimiento de las bioseparaciones. De tal manera que el volumen de producción está dado por:

$$VPrd = \frac{\left[\text{Demanda } \left(\frac{\text{kg}}{\text{año}}\right)\right] [\text{Participación } (\%)]}{\left[\text{Productividad } \left(\frac{\text{kg}}{\text{L} - \text{año}}\right)\right] [\text{Rendimiento global } (\%)]} \tag{14.1}$$

En el caso de productos intracelulares, la productividad del bioproceso depende de la concentración celular alcanzable (kg/L) o rendimiento volumétrico y de la concentración específica del producto en la célula (kg/kg) o rendimiento específico. También depende del tiempo de procesamiento para sistemas por lotes o del tiempo de residencia para sistemas continuos. Entre menores sean estos tiempos mayor productividad. La productividad anual se estima considerando el tiempo anual de operación (TAO), de tal manera que,

$$\left[\text{Productividad } \left(\frac{\text{kg}}{\text{L} - \text{año}}\right)\right] =$$

$$= \frac{\left[\text{Rend. volumétrico } \left(\frac{\text{kg}}{\text{L}}\right)\right] \left[\text{Rend. específico } \left(\frac{\text{kg}}{\text{kg}}\right)\right] \left[\text{TAO } \left(\frac{\text{h}}{\text{año}}\right)\right]}{[\text{Tiempo de procesamiento (h)}]} \quad (14.2)$$

14.2.2. Modelo del Bioproceso

El modelo del bioproceso se integra con tres submodelos: a) biológico, b) físico y c) de costos. A continuación se describen brevemente cada uno de estos submodelos.

Submodelo biológico

El submodelo biológico comprende generalmente la cinética, la termodinámica (calor de reacción y equilibrio) y la estequiometría de las biorreacciones. Ésta es la información básica para el diseño de las operaciones previas del bioproceso (biorreactor, esterilizador de aire, preparación de medio). La cinética determina el tiempo necesario para lograr una conversión especificada, la termodinámica permite calcular la cantidad de calor que es necesario remover en el biorreactor y la estequiometría es la base para desarrollar los balances de masa del bioproceso. Esta información es obtenida a partir de los datos de laboratorio y/o planta piloto, así como de la literatura.

Submodelo físico

El submodelo físico se basa en el diagrama de flujo desarrollado en la síntesis del bioproceso, organizado por secciones, *v.g.* fermentación, recuperación, concentración, purificación y empaque. Incluye todas las operaciones y procesos unitarios necesarios para la obtención del producto. Las operaciones unitarias son los pasos básicos en el bioproceso como la esterilización, la fermentación y la cromatografía. Los proceso unitarios comprenden un conjunto de acciones que se desarrollan secuencialmente para llevar acabo una operación unitaria. Por ejemplo, equilibrar, adsorber, lavar, eluir y regenerar una columna durante la operación cromatográfica. El submodelo físico también requiere de datos de todos los materiales que entran y salen del proceso, incluyendo sus principales propiedades físicas y químicas.

Submodelo de costos

El submodelo de costos involucra los costos unitarios y los métodos de estimación de costos necesarios para calcular los costos de inversión y operación de un bioproceso dado. Esta información se obtiene a partir de los proveedores o bien de bancos de datos disponibles.

14.2.3. Balances de Masa y Energía

Los balances de masa y energía permiten estimar la entrada y salida de materiales y calor de cada una de las operaciones. Esto se utiliza para dimensionar los equipos y estimar los costos asociados.

14.2.4. Evaluación Económica

La evaluación económica de bioprocesos es una herramienta que involucra el análisis de los ingresos esperados, los costos de adquisición del equipo, la inversión total de capital y el costo anual de operación. Tiene por objetivo principal medir la eficiencia de la inversión propuesta, particularmente su rentabilidad.

Existen varios índices que se utilizan en forma integral para medir la rentabilidad de los bioprocesos, que pueden ser clasificados en dos tipos: a) métodos que no toman en cuenta el valor del dinero en el tiempo como el margen bruto, el retorno sobre la inversión y el periodo de pago en años (estos métodos han sido presentados en el capítulo 2 de este libro) y b) métodos que toman en cuenta el valor del dinero en el tiempo como el método del valor presente neto (VPN) y el método de la tasa interna de rendimiento (TIR).

Tanto el VPN como el TIR requieren para su aplicación los siguientes datos: a) la inversión requerida, b) el horizonte de planeación o vida del proyecto, c) el valor de salvamento de las inversiones, d) el rendimiento mínimo aceptable para la inversión y e) los flujos netos de efectivo estimados para cada periodo de la vida del proyecto. Hemos visto que estos flujos se calculan de la siguiente forma:

Ingresos − Costo operación
Utilidad bruta − ISR
Utilidad neta + Depreciación
Flujo de efectivo

Método del VPN

El método del valor presente neto consiste en calcular la suma algebraica de los flujos netos de efectivo actualizados utilizando una tasa de descuento, que generalmente es la tasa de rendimiento mínima aceptable (TREMA). La ecuación para el cálculo del VPN es:

$$VPN = -F_0 + \sum_{t=1}^{n} \frac{F_t}{(1+i)^n} \tag{14.3}$$

donde:

F_0: Inversión inicial.

F_t: Flujo neto de efectivo del periodo t.

i: Tasa de descuento o actualización.

Cuando el valor presente neto es positivo ($VPN > 0$) la rentabilidad del bioproceso es mayor al TREMA y es un indicador positivo para la evaluación.

Método del TIR

La tasa interna de rendimiento es la tasa de descuento que iguala a cero el valor presente neto de los flujos de un proyecto. La ecuación para el cálculo del TIR es:

$$VPN = -F_0 + \sum_{t=1}^{n} \frac{F_t}{(1+i)^n} = 0 \tag{14.4}$$

donde:

F_0: Inversión inicial.

F_t: Flujo neto de efectivo del periodo t.

i: TIR

Cuando la tasa interna de rendimiento es mayor al TREMA ($TIR > TREMA$), la rentabilidad del bioproceso es mayor al TREMA y es un indicador positivo para la evaluación.

14.3. Caso de Diseño

Para describir el desarrollo de un diseño específico, se utilizará el caso de un bioproceso por lotes para la obtención de plásmidos para uso médico a partir de caldos fermentados con *E. coli* como bacteria hospedera. El proceso se caracteriza por el uso de operaciones de membrana tanto para la recuperación como para la purificación del plásmido.

14.3.1. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de DNA cerradas y de doble hélice, presentes en bacterias. Se caracterizan porque se pueden replicar de manera independiente del DNA genómico (gDNA). Actualmente, el desarrollo de nuevas vacunas y terapias génicas utilizando DNA plasmídico ha generado una gran demanda de estas macromoléculas biológicas en condiciones de alta pureza, de acuerdo con los lineamientos de los organismos reguladores para su administración en seres vivos (Freitas *et al.*, 2006).

14.3.2. Diagrama de Bloques del Bioproceso

La Figura 14.2 muestra el diagrama de bloques del caso de diseño el cual se divide en 4 secciones: propagación del plásmido, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final. Durante la fermentación se propaga la cepa hospedera que contiene el plásmido de interés. La recuperación primaria

consiste en la cosecha celular, el rompimiento celular por medio de lisis alcalina y una neutralización. Los agregados indeseables formados son separados del caldo mediante filtración. En la recuperación intermedia se lava, purifica y concentra el caldo mediante diafiltración. La purificación final del plásmido se realiza mediante cromatografía de intercambio iónico. Finalmente, la solución de plásmido se lava y concentra por medio de una diafiltración.

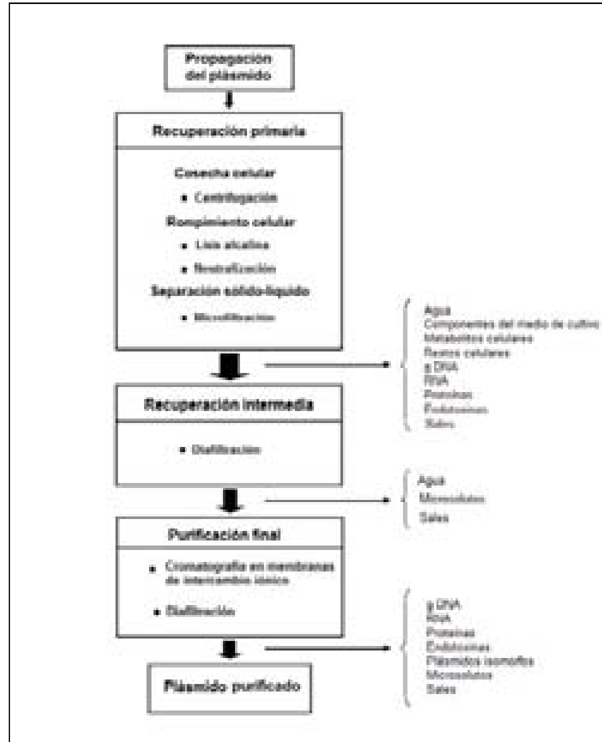


Figura 14.2: Diagrama de bloques de un proceso para la producción de plásmidos superenrollado basado en el uso de membranas.

A continuación se describen las acciones necesarias para el de diseño de este bioproceso.

14.4. Desarrollo del Diseño

Actualmente, es altamente recomendable el uso de simuladores computacionales para facilitar la representación y el análisis de todo el bioproceso. Varios simuladores como Aspen Plus, ChemCAD, HYSYS y PRO/II, son utilizados generalmente para el diseño de procesos de estado estacionario en la industria petroquímica. Algunos simuladores como SuperPro Designer, Biotechnology De-

Tabla 14.1: Datos del caso de diseño.

Concepto	Cantidad
Demanda	1.16×10^7 ampolletas/año
Dosis	2 mg/ampolleta
Rend. global	0.65
Rend. volumétrico	7 g de biomasa/L
Rend. específico	0.007 g de plásmido/g de biomasa

sign Simulator y Batches son específicos para el análisis de bioprocesos (Harrison *et al.*, 2003).

Típicamente, el diseño de un bioproceso utilizando un simulador como SuperPro Designer requiere realizar las siguientes actividades:

1. Descripción general de bioproceso.
2. Establecimiento de las bases de diseño.
3. Preparación del diagrama de flujo.
4. Incorporación de los procesos unitarios.
5. Especificaciones de equipos y corrientes.
6. Establecimiento de las bases para el análisis económico.
7. Simulación del bioproceso.
8. Análisis de resultados.

14.4.1. Descripción general del bioproceso

La etapa inicial del diseño comprende la descripción del proyecto como el nombre, fecha de inicio y datos generales. En esta etapa se define además el modo de operación (por lotes o continuo), tiempo anual de operación y el tiempo de duración de cada lote (cuando corresponda). En este caso de diseño el modo de operación es por lotes, el tiempo anual de operación es de $7,920$ h/año y la duración de los lotes 48 h.

14.4.2. Bases de Diseño

Para desarrollar el análisis del bioproceso es necesario establecer las bases del diseño, que están relacionadas con la demanda del producto y la tecnología de producción. En la Tabla 14.1 se presentan las bases correspondientes al presente caso. Mediante el uso de esta información se calcula la demanda de plásmido, el volumen de operación del fermentador y las entradas al bioproceso.

Demanda anual

Con los datos anteriores es necesario calcular la demanda de plásmido,

Tabla 14.2: Composición del medio de cultivo para la producción de plásmidos.

Compuesto	**Composición**
Triptona	16.0 g/L
Extracto de levadura	10.0 g/L
Cloruro de sodio	5.0 g/L
Kanamicina	0.1 g/L

$$\text{Demanda} = 1.16 \times 10^{7}\ \frac{\text{amp}}{\text{año}} \times 2\ \frac{\text{mg}}{\text{amp}} \times \frac{\text{kg}}{10^{6}\ \text{mg}} = 23.2\ \frac{\text{kg}}{\text{año}}$$

Volumen de operación del fermentador

Mediante el uso de la ecuación (14.1) se calcula el volumen de operación (este volumen es una fracción del volumen del equipo, en este caso es el 80 %) del fermentador,

$$V = \frac{23.2\ \frac{\text{kg}}{\text{año}} \times \frac{10^{3}\ \text{g}}{\text{kg}} \times \frac{\text{año}}{7920\ \text{h}}}{\left(\frac{7\ \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.007\ \frac{\text{g}}{\text{g}}}{48\ \frac{\text{h}}{\text{lote}}}\right) \times 0.65} = 4,415\ \frac{L}{\text{lote}}$$

El volumen de operación se ajusta considerando una pérdida por evaporación de aproximadamente 2 %, de tal manera que:

$$V = \frac{4,415\ \frac{\text{L}}{\text{lote}}}{(1 - 0.02)} = 4,500\ \frac{\text{L}}{\text{lote}}$$

Entradas al bioproceso

Para realizar la simulación es necesario establecer las entradas de masa al bioproceso (agua, medio sólido y antibiótico) tomando como base el volumen de operación y la composición del medio de cultivo (Tabla 14.2). En este caso se utilizan 4, 226 L de agua y 131 kg de medio por cada lote.

14.4.3. Preparación del Diagrama de Flujo

En base a toda la información obtenida sobre el bioproceso se definen los componentes puros y mezclas que se utilizan en el bioproceso (esta información puede ser obtenida de las bases de datos del programa o ser definida por

el usuario). También se prepara el diagrama de flujo del mismo. Esta actividad comprende la incorporación de las operaciones unitarias y las corrientes respectivas. El diagrama de flujo del caso de diseño se presenta en la Figura 14.3 y consta de 5 secciones: propagación del plásmido, recuperación primaria, recuperación intermedia, purificación final y empacado.

Propagación del plásmido

El medio se prepara en un tanque de acero inoxidable (P-1) y se esteriliza en un equipo continuo (P-2). El fermentador se inocula con *E. coli* que contiene el plásmido de interés. La solución de kanamicina que se utiliza para evitar el crecimiento de *E. coli* sin plásmido o de otros microorganismos se prepara en el tanque (P-3) y se filtra para ser esterilizada en el filtro (P-4). El aire para la fermentación es proporcionado por un compresor axial (P-5) debidamente filtrado (P-6) a una velocidad de 1.5 vvm. La fermentación se realiza en el biorreactor (P-7) por 24 h a 37 °C. La concentración final en el biorreactor es de 7.0 g/L en peso seco. Los gases de salida del biorreactor antes de ser liberados son procesados en el filtro (P-8). El caldo final de la fermentación se almacena temporalmente en un tanque (P-9).

Recuperación primaria

La biomasa se cosecha en una centrífuga (P-10) que remueve el 98 % de la biomasa y concentra el caldo 20 veces aproximadamente. Después de la centrifugación la pasta se resuspende y se somete a un proceso de lisis alcalina con NaOH en el biorreactor (P-11). Al final de la lisis la solución se neutraliza con acetato de potasio que permite precipitar restos celulares, DNA genómico y proteínas contaminantes. Este precipitado es removido por un sistema de filtración (P-12, P-13 y P-14).

Recuperación intermedia

Para lavar, purificar parcialmente y concentrar el caldo se utiliza una unidad de diafiltración (P-15). El caldo se concentra primeramente 5 veces, después se lava diez veces y finalmente se concentra de nuevo dos veces.

Purificación final

La purificación final del caldo se realiza en 5 columnas de membranas de intercambio iónico que operan en paralelo a razón de 4 ciclos por lote (P-16). La operación se realiza en forma frontal en la etapa de adsorción y eluyendo con gradiente salino. Para su preparación final la solución de plásmido eluida de la columna se concentra 2 veces, se lava 10 veces y se vuelve a concentrar 5 veces, en el equipo de diafiltración (P-17). Finalmente, la solución se esteriliza mediante filtración (P-18).

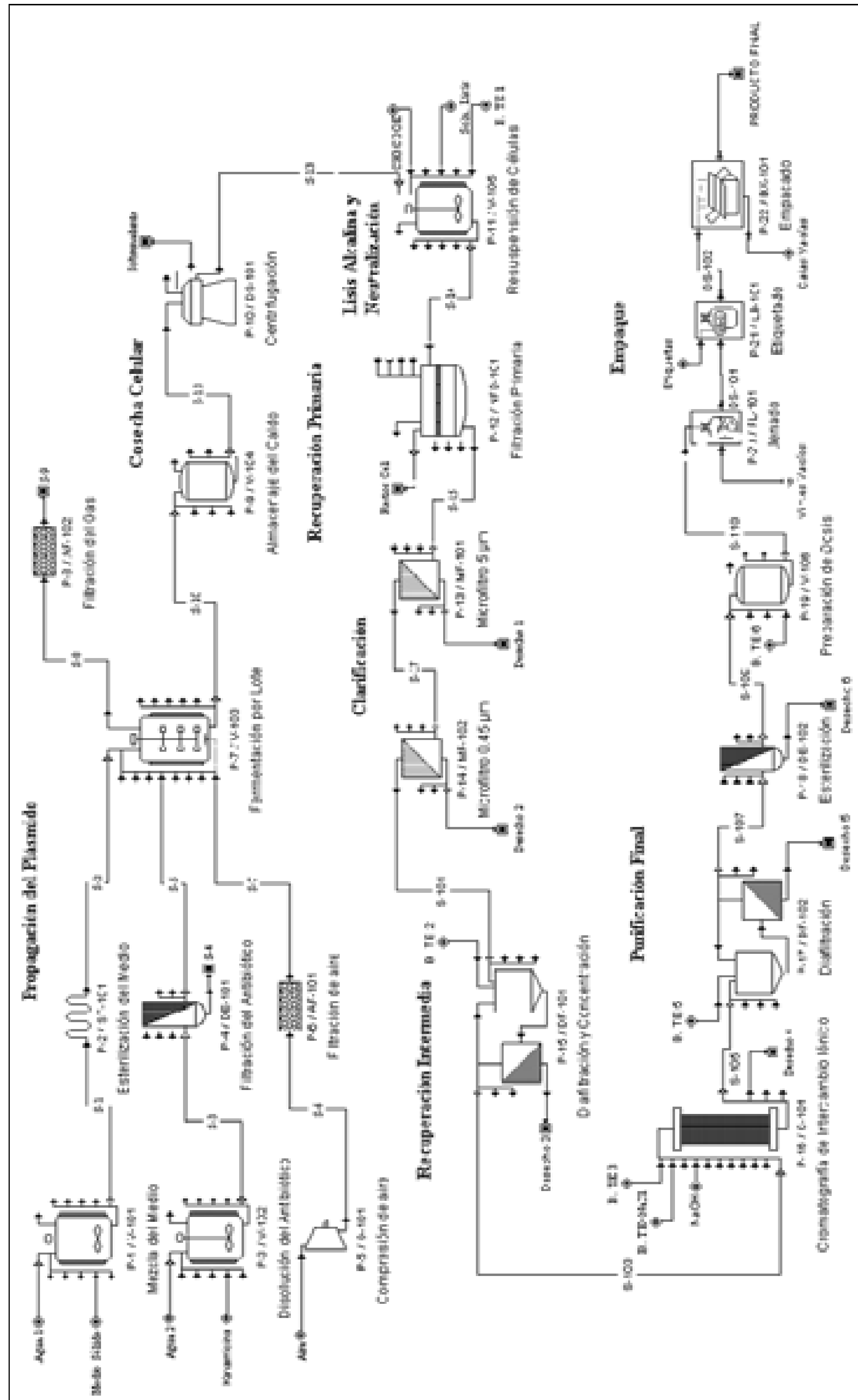


Figura 14.3: Diagrama de flujo del bioproceso para la producción de plásmidos superenrollado basado en el uso de membranas.

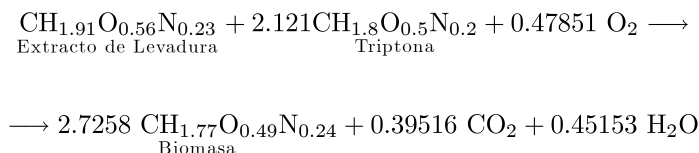
Empacado

La solución esterilizada se almacena en un tanque (P-19) y se usa para el llenado de ampolletas (P-20). Finalmente las ampolletas se etiquetan (P-21) y empacan en cajas de tres ampolletas (P-22).

14.4.4. Incorporación de los Procesos Unitarios

Algunas operaciones del bioproceso implican varias acciones secuenciales o procedimientos. Por ejemplo, la fermentación requiere el proceso unitario que comprende la transferencia de nutrientes, la transferencia de antibiótico, la fermentación, la salida del fermentado, la limpieza y la esterilización.

Cada acción del proceso debe ser claramente especificada. En el caso de la fermentación es necesario definir la estequiometría de la biorreacción, que en este caso en moles está dada por:

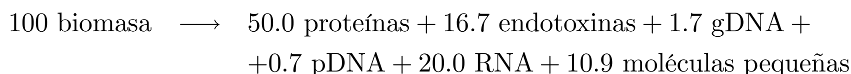


$$\underset{\text{Extracto de Levadura}}{CH_{1.91}O_{0.56}N_{0.23}} + 2.121\underset{\text{Triptona}}{CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}} + 0.47851\ O_2 \longrightarrow$$

$$\longrightarrow 2.7258\ \underset{\text{Biomasa}}{CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}} + 0.39516\ CO_2 + 0.45153\ H_2O$$

También se especifica para la fermentación entre otros datos, la temperatura operación de 37 °C, el tiempo de la fermentación 24 h, la concentración celular a la salida del fermentador 7.0 g/L, la entalpia de reacción $\Delta H = -3,747.2$ kcal/kg y la cantidad de aire necesario 1.5 vvm.

Otra operación que requiere la definición de su procesos unitarios es la lisis que comprende agregar buffer de resuspensión, cargar la suspensión de biomasa, agitar, resuspender, enfriar, agregar solución de lisis, la lisis, cargar solución de precipitación, precipitar, transferir a un filtro y la limpieza en su sitio. La lisis también involucra definir una estequiometría en base a la composición de la cepa hospedera, en este caso utilizando unidades de masa:



$$\begin{aligned} 100\ \text{biomasa} \quad \longrightarrow \quad & 50.0\ \text{proteínas} + 16.7\ \text{endotoxinas} + 1.7\ \text{gDNA} + \\ & +0.7\ \text{pDNA} + 20.0\ \text{RNA} + 10.9\ \text{moléculas pequeñas} \end{aligned}$$

También la cromatografía es una operación que requiere la definición de su proceso unitario que consiste en equilibrado, carga, lavado, elución y lavado de la columna.

Para cada acción dentro del proceso unitario, el simulador incluye un modelo para calcular los balances de masa y energía. Con base en los balances de masa también calcula el tamaño de los equipos. Si existe diferencia en el tamaño necesario para cada acción el programa selecciona el que sea útil para todo el proceso.

14.4.5. Especificaciones de Equipos y Corrientes

Una información que es necesario proporcionar es la relacionada al funcionamiento de los equipos y sus procesos unitarios. En el caso de los equipos de separación como filtros y centrífugas es necesario especificar los tamaños de corte, tiempo de filtración y las áreas de las unidades. En los tanques se especifican propiedades como el material de construcción, el porciento del volumen de operación y la presión de operación.

En esta fase también se requiere establecer la información relacionada a las corrientes de entrada a los equipos en cuanto a su composición, temperatura y en algunos casos el volumen. El cálculo del volumen frecuentemente se realiza en función de factores de dilución, lavado y elución de los equipos. Por ejemplo, una vez que se conoce la concentración de la suspensión de biomasa obtenida después de la centrifugación, es posible establecer el volumen de la solución de resuspensión para obtener una suspensión (diluida) manejable para la lisis.

14.4.6. Bases del Análisis Económico

Para realizar el análisis económico del bioproceso es necesario establecer los parámetros para realizar los cálculos de: a) la evaluación económica, b) la inversión total de capital y c) los costos de operación. En este caso todas las cifras se manejan en dólares.

Parámetros para la evaluación económica

Los parámetros financieros y técnicos para realizar la evaluación económica del caso de diseño se presentan en la Tabla 14.3. Se establece un precio de $10.00/caja de producto. El análisis económico se realiza sobre el proyecto sin financiamiento. Este enfoque permite calcular la eficiencia inherente al proyecto. El horizonte de planeación del proyecto son 15 años y se consideran 3 años para construcción y arranque. El plan de producción establece un 100 % de utilización de la capacidad instalada del año 4 al año 15. Los equipos se deprecian linealmente en 10 años con un valor de salvamento del 10 %. Se considera un impuesto sobre la renta del 40 % y los flujos se descuentan con un TREMA del 7 %.

Parámetros para el cálculo de la inversión total de capital

En este caso el cálculo de la inversión total de capital se realiza utilizando como concepto básico de evaluación el costo de adquisición del equipo. El costo de adquisición de un bien de uso representa el sacrificio económico para adquirir el bien y ponerlo en condiciones de ser utilizado en la actividad. Este incluye la compra del equipo y demás erogaciones necesarias, como fletes, seguros, honorarios de aduana, trámites de registro, la construcción de plataformas, el montaje y la puesta en operación.

Tabla 14.3: Parámetros para la evaluación económica del caso de diseño.

Concepto	**Valor**
Precio	\$10.00/caja
Financiamiento	Sólo operación
Vida del proyecto	15 años
Periodo de arranque	3 años
Plan de producción (años 4-15)	100 % anual
Depreciación	lineal 10 años
Valor de salvamento	10 %
Impuesto sobre la renta	40 %
TREMA	7 %

La fecha límite para la activación de un componente en el costo de adquisición de un bien es aquella en la cual el bien se pone en marcha, los gastos en que se incurra después de esa fecha serán considerados costos del periodo de operación respectivo.

En la Tabla 14.4 se presentan los multiplicadores utilizados para la estimación de la inversión total de capital que se integra por la inversión fija directa, el capital de trabajo y los costos de arranque y validación ($TCI = DFC + WC + SVC$).

Parámetros para el cálculo de los costos de operación

En la Tabla 14.5 se presentan algunos parámetros utilizados en el cálculo de los costos de operación. Las materias primas comprenden medio de cultivo, membranas, reactivos químicos y materiales de limpieza. En el presente caso los costos de las materias primas se obtuvieron de la base de datos del programa y algunos de ellos como el de las membranas fueron obtenidos de los proveedores. Los costos de operación y mantenimiento se estimaron utilizando multiplicadores. El costo de la mano de obra y supervisión se calculó en base a las horas de operación de los equipos. El costo de los servicios se realizó con base a los costos unitarios respectivos. Dentro de los costos fijos se contempla la depreciación lineal a 10 años de la inversión fija directa.

14.4.7. Simulación del Bioproceso

Una vez que se ha construido el diagrama de flujo y se ha proporcionado la información técnica y económica necesaria, el programa permite simular el bioproceso para: a) obtener los balances de masa y energía, b) estimar tamaños y número de los equipos, c) calcular las necesidades de mano de obra y servicios, d)

Tabla 14.4: Rubros para la estimación de la inversión total de capital (TCI).

Rubro	**Concepto**	**Monto**
Costos directos totales de planta ($TPDC$)		
	Adquisición de equipo	$1.00 \times PC$
	Instalación de equipo	$0.40 \times PC$
	Tubería	$0.35 \times PC$
	Instrumentación	$0.40 \times PC$
	Aislamiento	$0.03 \times PC$
	Electricidad	$0.10 \times PC$
	Edificios	$0.45 \times PC$
	Acondicionamiento	$0.15 \times PC$
	Servicios	$0.40 \times PC$
Costos indirectos totales de planta ($TPIC$)		
	Ingeniería	$0.25 \times TPDC$
	Construcción	$0.35 \times TPDC$
Costo total de planta (TPC)		$TPDC + TPIC$
Otras inversiones (AC)		
	Consultarías	$0.05 \times TPC$
	Contingencias	$0.10 \times TPC$
Inversión fija directa (**DFC**)		$TPC + AC$
Capital de trabajo (**WC**)		
	Mano de obra	30 días
	Materias primas	30 días
	Servicios	30 días
	Tratamientos	30 días
Capital de arranque y validación (SVC)		$0.05 \times DFC$

Tabla 14.5: Rubros del costo anual de operación.

I. Costos de Operación	
Directos Variables	
A. Materias primas y suministros	a. Materias primas:
	Base de datos y usuario
	b. Costo de operación: 0.06 $TPDC$
	c. Mantenimiento: 0.10 PC
B. Mano de obra y supervisión	a. Horas equipo
C. Servicios	a. Vapor: \$4.20/100 kg
	b. Electricidad: \$0.1/ kW−h
	c. Agua: \$0.10/1000 kg agua fría
	d. Tratamiento de desechos: \$0.3/m^3
II. Costos Fijos	
A. Depreciación	a. 0.1 DFC

Tabla 14.6: Materias primas del proceso global.

Material	kg/año	kg/lote
Agua	2,651,791	16,169
NaCl	9,992	61
Triptona	11,080	68
Ext. levadura	6,924	42
NaOH	267	2
Aire	1,821,930	11,109
EDTA disódico	334	2
TRIS HCl	1,383	9
Agua inyectable	529,076	3,226
SDS	742	5

estimar la duración de cada ciclo de trabajo, e) realizar la evaluación económica y f) evaluar el impacto ambiental del bioproceso. La información generada se puede obtener mediante reportes detallados con información como la que se presenta a continuación.

Balances de masa

En la Tabla 14.6 se presentan algunos datos del balance de masa global del caso de diseño en kg/año y en kg/lote, considerando la producción de 164 lote/año y una duración de 48 h/lote. Estos reportes también pueden ser obtenidos por sección del bioproceso.

Evaluación económica

Una vez efectuados los balances de masa y energía se puede proceder a calcular el flujo de efectivo correspondiente y realizar la evaluación económica del bioproceso. En la Tabla 14.7 se presentan algunos datos de la evaluación económica relacionados al caso de diseño, de los rubros de flujo de efectivo, inversión total requerida e índices de evaluación.

14.4.8. Análisis de Resultados

El bioproceso tiene un margen bruto del 73 % que refleja una diferencia considerable entre los ingresos y los costos de operación. El ROI y el periodo de retorno indican que la inversión se recupera al primer año de producción. La tasa interna de rendimiento es del 57 % que es sustancialmente mayor al TREMA del 7 % empleado en el análisis. El valor presente neto del proyecto es

Tabla 14.7: Evaluación económica del caso de diseño

Rubro	Concepto	Valor
Flujo de efectivo	Ingresos	\$40,311,000/año
	Costo de operación	\$10,930,000/año
	Costo unitario	\$2.71/caja
Inversión	Inversión total de capital	\$18,669,000
Evaluación	Margen bruto	73 %
	Retorno sobre la inversión (ROI)	103 %
	Periodo de retorno	1 año
	Tasa interna de rendimiento (TIR)	57 %
	Valor presente neto (VPN)	\$111,253,000

positivo y considerablemente alto debido también al TREMA del 7 % utilizado para descontar los flujos.

El análisis de resultados puede ampliarse mediante un análisis de sensibilidad para evaluar el impacto de los parámetros críticos (rendimientos, costos y precio) sobre los indicadores claves del bioproceso como la rentabilidad, el costo de producción y la productividad.

En la Figura 14.4a se presenta en forma gráfica la sensibilidad del TIR y el periodo de retorno del bioproceso al precio de venta de la caja de producto. Ambos índices mejoran de forma significativa con el precio, mostrándose una dependencia prácticamente lineal del TIR con el precio en el rango estudiado. La Figura 14.4b muestra el efecto de la variación de la concentración celular alcanzada en el biorreactor sobre los mismos indicadores. En este caso la mejora de los indicadores es más acentuada, lo que permite visualizar la importancia que representa la optimización de la fermentación para el éxito de este tipo de bioprocesos.

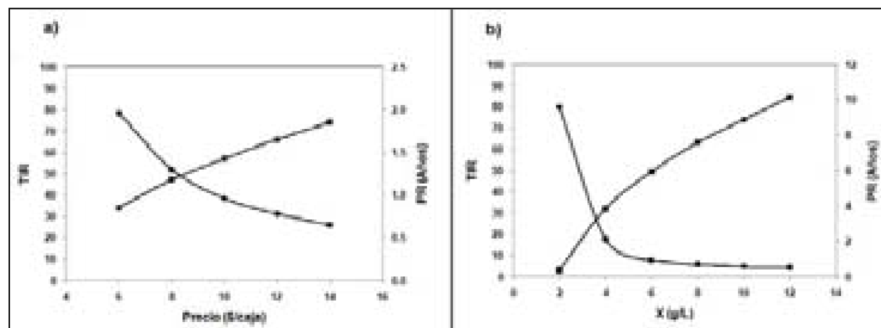


Figura 14.4: Análisis de sensibilidad del TIR (■) y el periodo de retorno (•). a) Efecto del precio de venta y b) Efecto de la concentración celular alcanzada en el biorreactor.

Cuando existe incertidumbre en los parámetros críticos, el análisis de sensibilidad puede complementarse con simulaciones Monte Carlo que permitan cuantificar tal incertidumbre. En este método las variables de diseño que presentan incertidumbre se representan mediante distribuciones de probabilidad. La simulación se conduce evaluando diferentes escenarios a partir de los valores de probabilidad de las variables. Los resultados se evalúan estadísticamente para cuantificar el riesgo y determinar la confiabilidad de obtener los valores deseados de los indicadores claves del bioproceso (Petrides, 2010).

14.5. Sumario

El análisis de un bioproceso consiste en la evaluación y comparación de diagramas de flujos alternativos para la obtención del producto de interés, integrados por las operaciones unitarias seleccionadas durante la síntesis del bioproceso.

La metodología requiere considerar por un lado aspectos de mercado como el precio y la demanda específica del producto. Por otro lado, aspectos técnico-económicos como la producción anual, las dimensiones de los equipos, las necesidades de insumos, los costos asociados, la inversión proyectada y el impacto ambiental. Actualmente, es altamente recomendable el uso de simuladores computacionales para facilitar la representación y el análisis de todo el bioproceso. El uso de estas herramientas se describe mediante el desarrollo de un caso de un bioproceso por lotes para la obtención de plásmidos para uso médico a partir de caldos fermentados con *E. coli* como bacteria hospedera.

14.6. Problemas

14.1. Producción de tPA. Se desea evaluar un bioproceso para la purificación de tPA a partir de leche de cabra transgénica (Goldman *et al.*, 2002). En la siguiente tabla se presentan los datos de mercado y de costos.

Concepto	**Valor**
Demanda anual tPA	100 kg
Dosis	100 mg
Precio	\$350/dosis
Concentración	20 g de tPA/L de leche
Costo leche	\$4,000/L

Se pide:

a) Desarrollar el diagrama de flujo del bioproceso consultando la literatura (*v.g.* Morcol y Bell, 2001).

b) Calcular el TIR y el VPN del proyecto.

c) Evaluar el efecto sobre el TIR de la variación del costo de la leche en ± 20 y $\pm 10\,\%$.

14.2. Producción de albúmina de suero humana (ASH). Para la evaluación de un bioproceso para la producción de ASH (proteína no glicosilada) a partir de un extracto de plantas de tabaco recombinante (*Nicotiana tabacum*) obtenido en la etapa de recuperación primaria de la proteína, se cuenta con los datos siguientes (Goldman *et al.*, 2002):

Concepto	**Valor**
Demanda anual ASH	150 ton
Precio	\$3.56/g
Concentración	200 g de ASH/L de extracto
Costo extracto	\$100/L
Peso molecular	66,500 Da

De acuerdo a los datos técnicos obtenidos se requiere procesar 5,000 L/día de extracto para cumplir con la demanda proyectada.

Se pide:

a) Desarrollar el diagrama de flujo del bioproceso consultando la literatura, (*v.g.* Holler y Zhang, 2008).

b) Calcular el TIR y el VPN del proyecto.

14.7. Bibliografía

Freitas, S.; Canário, S.; Santos, J.A.; Prazeres, D.M. **2009**. Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnol J.* 4, 265-278.

Freitas, S.; Santos, J.; Prazeres, M. **2006**. Plasmid DNA. En: Heinzle, E.; Biwer, P.; Cooney, C. *Development of Sustainable Bioprocesses Modeling and Assessment.* John Wiley and Sons, Ltd. p. 270-285.

Goldman, I.L.; Kadulin, S.G.; Razin, S.V. **2002**. Transgenic goats in the world pharmaceutical industry of the 21st century. *Russian J. Genetics.* 38, 1-14.

Harrison, R.G.; Todd, P.W.; Rudge, C.R.; Petrides, D. **2003**. *Bioseparations science and engineering.* Cap. 11. Oxford University Press.

Holler, C.; Zhang, C. **2008**. Purification of an acidic recombinant protein from transgenic tobacco. *Biotech. Bioeng.* 99, 902-909.

Marcol, T.; Bell, S.J.D. **2001**. Method for processing milk. US6183803.

Nfor, B.K.; Ahamed, T.; van Dedem, G.W.; van der Wielen, L.A.; van de Sandt, E.J.; Eppink, M.H.; Ottens, M. **2008**. Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83,124–132.

Petrides, D.; Koulouris, A.; Siletti, C.; Jiménez, J.; Lagonikos, P. **2010**. The role of simulation and scheduling tools in the development and manufacturing of active pharmaceutical ingredients. am Ende, D.J. (Ed.). *Chemical Engineering in the Pharmaceutical Industry: From R&D to Manufacturing.* John Wiley and Sons.

Índice alfabético

El libro de *Bioseparaciones* está diseñado para ser usado por estudiantes de licenciatura, de posgrado y profesionales de la industria, de los diversos campos relacionados con los procesos biotecnológicos.

El texto se divide en seis partes. La primera parte constituye una introducción a los procesos de bioseparación. En las siguientes cuatro partes: Recuperación del Producto, Concentración, Purificación y Acabado; se abordan las principales operaciones de bioseparación siguiendo una secuencia típica de un bioproceso, tratando con ello de conservar un enfoque unitario más que describir procesos particulares. La última parte se relaciona con el Diseño del Bioproceso e integra los aspectos que se revisan en las partes previas.

- En cada capítulo, dedicado a una operación determinada, se presentan los fundamentos de dicha operación, los equipos comúnmente empleados para realizarla y los principales métodos de diseño.

Aspectos relevantes

- Se presenta un tratamiento detallado y actualizado de las principales operaciones de bioseparación utilizadas en los bioprocesos.

- Se incluyen varios ejemplos y problemas propuestos en cada capítulo.

- Un buen número de ejemplos y problemas propuestos se resuelven con MATLAB. Cada capítulo contiene bibliografía de consulta.

- Se incluye un capítulo final integrador sobre el análisis y evaluación de esquemas de bioseparación utilizando paquetes de computación.

Acerca de los autores
Armando Tejeda Mansir. Es Profesor-Investigador de la Universidad de Sonora, dedicado a la enseñanza y estudio de las Bioseparaciones. Su investigación está orientada a los aspectos fundamentales y de aplicación de estas operaciones.

Rosa María Montesinos Cisneros. Es Profesora-Investigadora de la Universidad de Sonora. Realiza trabajos sobre operaciones de purificación de biomoléculas y solución de modelos dinámicos del comportamiento de columnas cromatográficas.

Roberto Guzmán Zamudio. Es Profesor del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad de Arizona. Su investigación se centra en la tecnología de interacciones de afinidad con énfasis en la separación de iones metálicos y proteínas.

ISBN 978-607-32-0945-8



Visítenos en:
www.pearsoneducacion.net
www.uson.mx